

**VALIDACION DE LA METODOLOGIA PARA EL ANALISIS DE MERCURIO EN
AGUA TRATADA Y CRUDA, Y ESTANDARIZACION DEL ANALISIS DE
MERCURIO EN PESCADOS POR EL METODO DE ABSORCION ATOMICA-
VAPOR FRIO PARA EL LABORATORIO DE ANALISIS DE AGUAS Y
ALIMENTOS DE LA UNIVERSIDAD TECNOLOGICA DE PEREIRA.**

PABLO RIVERA MACHADO

JUAN SEBASTIAN VALENCIA HERRERA

UNIVERSIDAD TECNOLOGICA DE PEREIRA

FACULTAD DE TECNOLOGIA QUIMICA.

ESCUELA DE QUIMICA

TRABAJO DE GRADO.

PEREIRA

2013

**VALIDACION DE LA METODOLOGIA PARA EL ANALISIS DE MERCURIO EN
AGUA TRATADA Y CRUDA, Y ESTANDARIZACION DEL ANALISIS DE
MERCURIO EN PESCADOS POR EL METODO DE ABSORCION ATOMICA-
VAPOR FRIO PARA EL LABORATORIO DE ANALISIS DE AGUAS Y
ALIMENTOS DE LA UNIVERSIDAD TECNOLOGICA DE PEREIRA.**

PABLO RIVERA MACHADO

1088269851

JUAN SEBASTIAN VALENCIA HERRERA

1088260864

Trabajo de grado, presentado como requisito parcial para optar al título de:

QUIMICO INDUSTRIAL

DIRECTOR: ARIEL FELIPE ARCILA ZAMBRANO

Químico Industrial

UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE PEREIRA

FACULTAD DE TECNOLOGÍA

ESCUELA DE QUÍMICA

PEREIRA

2013

**VALIDACION DE LA METODOLOGIA PARA EL ANALISIS DE MERCURIO EN
AGUA TRATADA Y CRUDA, Y ESTANDARIZACION DEL ANALISIS DE
MERCURIO EN PESCADOS POR EL METODO DE ABSORCION ATOMICA-
VAPOR FRIO PARA EL LABORATORIO DE ANALISIS DE AGUAS Y
ALIMENTOS DE LA UNIVERSIDAD TECNOLOGICA DE PEREIRA.**

PABLO RIVERA MACHADO

JUAN SEBASTIAN VALENCIA HERRERA

CALIFICACION _____

ARIEL FELIPE ARCILA ZAMBRANO

QUIMICO INDUSTRIAL

DIRECTOR

JURADO

AGRADECIMIENTOS.

- A Dios por la vida y las ganas de llevar a buen término nuestros sueños y metas.
- A nuestros padres por apoyarnos incondicionalmente en nuestro camino hacia conseguir nuestras metas.
- A todo el personal del laboratorio de análisis de aguas y alimentos de la Universidad Tecnológica de Pereira por su paciencia y comprensión en la realización de la parte experimental de este proyecto.
- A nuestro director Ariel Felipe Arcila Zambrano por su paciencia, dedicación, apoyo y enseñanza en el desarrollo de este proyecto.
- A todos nuestros profesores y compañeros que en nuestra vida universitaria aportaron su granito de arena para enriquecer nuestro proceso de aprendizaje.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	3
2. OBJETIVOS.....	4
2.2. Objetivo General.....	4
2.3. Objetivos Específicos.	4
3. JUSTIFICACIÓN.....	6
4. MARCO TEORICO.....	8
4.1. Características generales del agua	8
4.1.1. Propiedades físicas del agua.....	8
4.1.1.1. Acción Disolvente.....	8
4.1.1.2. Fuerza de cohesión	9
4.1.1.3. Fuerza de adhesión.....	9
4.1.1.4. Calor de vaporización.....	9
4.1.2. Propiedades químicas del agua.....	9
4.2. Características de las Fuentes comunes de agua.....	10
4.3. Metales presentes en el agua.....	10
4.4. Mercurio.....	11
4.4.1. Generalidades.....	11
4.4.2. Mercurio en el medio ambiente.....	13
4.4.3. Efectos sobre la salud.....	14
4.4.3.1. Metilmercurio	14
4.4.3.2. Mercurio Elemental.....	16
4.5. Determinación de metales.....	16
4.6. Método de análisis de Mercurio en agua y pescados.....	17
4.7. Espectroscopia de absorción atómica-vapor frio para el análisis de mercurio.....	17

4.8. Interferencias en el análisis de mercurio por absorción atómica-vapor frío.....	19
4.9. Preparación de la muestra para el análisis de mercurio por absorción atómica-vapor frío.....	19
4.9.1. Destrucción de la materia orgánica en la muestra.....	19
4.9.2. Destrucción del color en la matriz digerida.....	20
4.10. Otras técnicas de análisis de mercurio en Aguas.....	20
4.11. Normatividad.....	21
4.12. Acreditación en Colombia.....	21
4.13. Fundamentación estadística.....	23
4.13.1. Metodología de la validación.....	23
4.13.1.1. Precisión.....	23
4.13.1.2. Exactitud.....	24
4.13.1.3. Linealidad.....	25
4.13.1.4. Límite de Detección.....	26
4.13.1.5. Límite de cuantificación.....	27
4.13.1.6. Robustez.....	27
4.13.1.7. Selectividad/ Especificidad.....	31
4.13.1.8. Repetibilidad.....	32
4.13.1.9. Reproducibilidad.....	32
4.13.2. Metodología de Estandarización.....	33
4.13.3. Incertidumbre.....	33
4.13.3.1. Aspectos generales.....	33
5. MATERIALES Y METODO.....	41
5.1. Materiales.....	41
5.1.1. Método de análisis de Mercurio por el método de espectrometría de absorción atómica-vapor frío.....	41
5.1.2. Muestra de análisis.....	41

5.2. METODOLOGÍA.....	42
5.2.1. Metodología para la validación.....	42
5.2.1.1. Reactivos.....	43
5.2.1.2. Curva de calibración.....	43
5.2.1.2.1. Metodología de la validación.....	43
5.2.1.3. Digestión de muestra.....	46
5.2.1.4. Preparación de las muestras para la medición.....	47
5.2.2. Metodología de estandarización.....	48
6. RESULTADOS.....	51
6.1. Análisis Preliminares.....	51
6.2. Análisis y datos de validación.....	59
6.3. Datos y análisis de la estandarización determinación de mercurio en peces.....	74
6.4. Cálculo de la incertidumbre.....	77
7. CONCLUSIONES.....	81
8. RECOMENDACIONES.....	82
9. BIBLIOGRAFIA.....	84
10. ANEXOS.....	87
10.1. Instructivo para la determinación de mercurio en aguas por absorción atómica-vapor frío.....	88
10.2. Instructivo para la determinación de mercurio en pescados por absorción atómica-vapor frío.....	100
10.3. Informe de validación del análisis de mercurio en agua tratada y cruda para el Laboratorio de Análisis de Aguas y Alimentos de la Universidad Tecnológica de Pereira.....	112

Índice de Tablas:

Tabla 1. Técnicas generales para el análisis de mercurio en agua y especies.....	20
Tabla 2. Valor aceptable para el mercurio según resolución 2115.....	21
Tabla 3. Parámetros requeridos para la lectura de mercurio por AA-CV.....	47
Tabla 4. Datos Curva de Calibración # 1.....	50
Tabla 5. Datos Curva de Calibración # 2.....	51
Tabla 6. Datos Curva de Calibración # 3.....	52
Tabla 7. Datos Curva de Calibración # 4.....	53
Tabla 8. Datos Curva de Calibración # 5.....	54
Tabla 9. Datos Curva de Calibración # 6.....	56
Tabla 10. Datos Curva de Calibración # 7.....	57
Tabla 11. Datos Curva de Calibración # 8.....	59
Tabla 12. Porcentajes de recuperación del primer ensayo de validación.....	59
Tabla 13. Datos Curva de Calibración # 9.....	61
Tabla 14. Variables estadísticas de la validación para agua tratada.....	61
Tabla 15. Porcentajes de recuperación para validación de agua tratada.....	62
Tabla 16. Datos curva de calibración # 10.....	63
Tabla 17. Datos curva de calibración # 11.....	65
Tabla 18. Datos curva de calibración # 12.....	66
Tabla 19. Variables estadísticas de la validación de agua cruda.....	67
Tabla 20. Porcentajes de recuperación de la validación de agua cruda.....	67
Tabla 21. Datos curva de calibración # 13.....	68
Tabla 22. Datos curva de calibración # 14.....	69
Tabla 23. Análisis de Varianza de 1 solo factor comparando si hay diferencia entre concentraciones de muestras con digestión y sin digestión.....	70
Tabla 24. Datos curva de calibración # 15.....	71
Tabla 25. Porcentajes de recuperación y concentraciones de muestras contaminadas con mercurio y guardadas durante 2 meses.....	72

Tabla 26. Variables estadísticas de las muestras contaminadas con mercurio y guardadas durante 2 meses.....	72
Tabla 27. Análisis de Varianza de 1 solo factor comparando si hay diferencia en la concentración de las muestras contaminadas con mercurio y guardadas durante 2 meses.....	73
Tabla 28. Datos curva de calibración # 28.....	74
Tabla 29. Datos curva de calibración # 17.....	75
Tabla 30. Datos curva de calibración # 18.....	76
Tabla 31. Porcentajes de recuperación de la estandarización de pescados.....	77
Tabla 32. Calculo de la incertidumbre.....	77

Índice de Figuras:

Fig. 1. Ciclo Biogeoquímico del Mercurio.....	14
Fig. 2 Esquema de generador de vapor frio.....	18
Fig. 3 Esquema para calcular incertidumbre total.....	35
Fig. 4 Montaje realizado para la digestión de pescados.....	48
Fig. 5 Representación gráfica de los diferentes volúmenes utilizados en los viales de reacción.....	50
Fig. 6 Fuentes de Incertidumbre.....	77

Índice de Graficas:

Grafica 1. Curva de Calibración # 1.....	51
Grafica 2. Curva de Calibración # 2.....	51
Grafica 3. Curva de Calibración # 3.....	52
Grafica 4. Curva de Calibración # 4.	53
Grafica 5. Curva de Calibración # 5.	54
Grafica 6. Curva de Calibración # 6.	56
Grafica 7. Curva de Calibración # 7.	57
Grafica 8. Curva de Calibración # 8.	59
Grafica 9. Curva de Calibración # 9.	61
Grafica 10. Curva de Calibración # 10.	63
Grafica 11. Curva de Calibración # 11.	65
Grafica 12. Curva de Calibración # 12.	67
Grafica 13. Curva de Calibración # 13.	69
Grafica 14. Curva de Calibración # 14.	70
Grafica 15. Curva de Calibración # 15.	71
Grafica 16. Curva de Calibración # 16.	74
Grafica 17. Curva de Calibración # 17.	75
Grafica 18. Curva de Calibración # 18.	77
Grafica 19. Aportes de la incertidumbre combinada en el cálculo de la incertidumbre total.....	80

RESUMEN

En el presente trabajo se realizó la validación del método de espectroscopia de absorción atómica-vapor frío para la determinación de Mercurio presente en agua cruda y tratada, además la estandarización del análisis de Mercurio en pescados. Las muestras fueron suministradas por el laboratorio de análisis de aguas y alimentos de la Universidad Tecnológica de Pereira; estas muestras se preservaron en el laboratorio añadiendo HNO_3 concentrado hasta obtener un $\text{pH} < 1$ se almacenaron en envases plásticos previamente lavados con una solución nítrica al 10% (v/v) y enjuagados varias veces con agua destilada y finalmente, fueron conservadas a 4°C hasta el momento de su análisis.

Para el desarrollo de la validación, se hizo uso de material volumétrico calibrado lavado adecuadamente con HNO_3 al 10% (v/v) y enjuagado con agua destilada.

Las determinaciones se efectuaron con un espectrofotómetro de absorción atómica SHIMADZU AA-7000, acoplado a un generador de vapor frío SHIMADZU. Se usó lámparas de cátodo hueco de Mercurio, operando a 253.75 nm y corriente de 4 mA.

Por último, se realizaron análisis estadísticos con los cuales se pudo determinar si el método a validar, era adecuado y cumplía con todas las especificaciones exigidas en la norma NTC/ISO/IEC 17025.

ABSTRACT

The present work will describe the validation of the method of atomic absorption spectroscopy-cold vapor used for the determination of mercury in raw water and potable water and standardizing the analysis of mercury in fish. Samples were given by the laboratory analysis of water and food of the UTP. These samples were preserved adding HNO_3 until they had a $\text{pH} < 1$, these were stored in plastic containers washed with a nitric solution 10% (v/v) and rinsed with distilled water and finally samples were conserved at 4 °C until the moment of the analysis.

Volumetric material, calibrated and washed with HNO_3 10% (v/v) was used through the validation process.

The determinations were made with a atomic absorption spectrophotometer SHIMADZU AA-7000 coupled to a cold vapor generator SHIMADZU. We used hollow cathode lamps Mercury, operating at 253.75 nm and current of 4 mA.

Finally, statistical analyzes were performed which could determine whether to validate the method was appropriate and met all specifications required by the NTC / ISO / IEC 17025.

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

El laboratorio de Análisis de Aguas y Alimentos de la Universidad Tecnológica de Pereira es un laboratorio perteneciente a la Escuela de Química, el cual está dedicado a la venta de servicios, este se encuentra acreditado por el ONAC para los parámetros de agua potable, entre ellos algunos metales, el laboratorio cuenta con un generador de vapor frío que se acopla al equipo de absorción atómica para el análisis de mercurio con límites de detección en el orden de partes por billón (ppb), por lo tanto se pretende validar la técnica para determinar el contenido de mercurio en agua tratada y cruda, y estandarizar el análisis de mercurio en pescados, los cuales se ajusten a los requerimientos establecidos por el Ministerio de la Protección Social y de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial, ya que este metal puede ingresar al cuerpo por vía oral y respiratoria, y ser absorbido por pulmones, estómago e intestino y una vez absorbido puede actuar como veneno, agente cancerígeno, provocar desórdenes neurológicos y causar daños en los riñones o la tiroides.[1].

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo General

Validar por el método de espectroscopia de absorción atómica-vapor frio el análisis de mercurio en agua cruda y tratada, y estandarizar el análisis de mercurio en pescados.

2.2. Objetivos Específicos

- Determinar las variables del método tales como límite de detección, límite de cuantificación, rango de linealidad, reproducibilidad y porcentaje de recuperación para confirmar que el método de ensayo tiene cualidades de desempeño acordes con lo que la aplicación requiere.
- Establecer las condiciones instrumentales experimentales para los análisis mediante ensayos previos con muestras patrón y realizar pruebas de confirmación para la metodología desarrollada con muestras reales del Laboratorio de Análisis de Aguas y Alimentos de la Universidad Tecnológica de Pereira.
- Realizar los ensayos de validación de acuerdo a la metodología planteada por el laboratorio de análisis de Aguas y Alimentos de la Universidad Tecnológica de Pereira.
- Documentar el procedimiento de validación para la determinación del contenido de Mercurio en el espectrómetro de absorción atómica con vapor frio del laboratorio de Análisis de Aguas y Alimentos de la Universidad Tecnológica de Pereira.
- Presentar los informes de validación para el análisis de mercurio en agua tratada y cruda de acuerdo a los datos recopilados, detallando las condiciones de cada ensayo así como los parámetros estadísticos obtenidos.

- Presentar los informes de estandarización para el análisis de mercurio en pescados de acuerdo a los datos recopilados, detallando las condiciones de cada ensayo así como los parámetros estadísticos obtenidos.
- Calcular la incertidumbre asociada a la determinación de mercurio en agua tratada y cruda, basados en los resultados estadísticos de la validación.

3. JUSTIFICACION

El factor más importante en la evolución de la vida sobre la Tierra es el agua líquida, que hay sobre la superficie del planeta. Las características físicas y químicas diferenciales del agua son tan cruciales para los sistemas vivos que la vida indudablemente no hubiera podido surgir en su ausencia. [2].

En Colombia existen alrededor de 3600 exploraciones mineras que operan sin título minero [3], lo cual indica que hay gran cantidad de exploraciones que realizan sus extracciones de oro de forma artesanal, el mercurio se adhiere al oro, formando una amalgama que facilita su separación de la roca, arena u otro material. Luego se calienta la amalgama para que se evapore el mercurio o se lava con ácido nítrico para diluir el mercurio y dejar el oro libre [4], las aguas residuales y los vapores generados en esta práctica tienden a ser liberados en cuerpos de agua y la atmosfera, siendo de esta forma que el hombre introduce grandes cantidades de mercurio en el ambiente, convirtiéndolo en un problema de salud para las comunidades aledañas a estas explotaciones mineras.

El mercurio se encuentra en bajas concentraciones en el ambiente. Los niveles de mercurio total generalmente son menores de 10 ng/g en materiales de la corteza, como granitos, feldespatos y arcillas; mientras que está en el rango de 40 a 200 ng/g en suelos y sedimentos que no están directamente impactados por descargas antrópicas. [5].

El mercurio es un metal presente en el ambiente tanto en forma natural (HgS) como introducido por el ser humano en sus diferentes actividades, siendo, en este particular, la minería artesanal para amalgamar el oro existente en aluviones y vetas, una vía de entrada de primer orden en los países en desarrollo. Es conocido que en el medio acuático, el mercurio metálico (Hg^0) es oxidado a monometilmercurio (MMHg), proceso que se desarrolla fundamentalmente bajo condiciones de pH menor que 7, suficiente carga orgánica y baja concentración de oxígeno. De esa manera, en los reservorios acuáticos, el mercurio puede ser incorporado a la cadena trófica y finalmente llegar hasta los peces donde se

bioacumula como MMHg, sustancia neurotóxica capaz de ocasionar graves daños al organismo, en muchos casos irreversibles. Se estima que la ingesta de peces contaminados constituye una vía importante para la introducción del MMHg en el organismo humano. [6].

El consumo de pescado contaminado con metilmercurio representa un riesgo mayor para las mujeres embarazadas que para el hombre adulto, ya que este contaminante pasa al feto provocándole daños neurológicos severos, por ser éste un organismo más susceptible. El sistema nervioso central es el tejido blanco principal de los efectos del metilmercurio en adultos, siendo las funciones más afectadas: la sensorial, la auditiva, y la visual, junto con las áreas del cerebro, y especialmente en el cerebelo las áreas relacionadas con la coordinación. Los efectos tempranos de la intoxicación son síntomas no específicos como: parestesia, indisposición ligera y visión borrosa. Existen evidencias de que el metilmercurio afecta el sistema inmunológico del hombre en exposición crónica. Se ha encontrado una asociación entre las anomalías neurológicas y la exposición a metilmercurio, mediante el consumo de pescado contaminado en hombres y mujeres adultos. [7]

La OMS ha establecido una ingesta diaria tolerable para metilmercurio de 0,48 µg/kg de peso corporal. [7]

Varios países han establecido en sus regulaciones sanitarias límites de mercurio total en especies de peces depredadores de 1 mg/kg y en otros productos pesqueros 0,5 mg/kg. [7]

Para el Ministerio de la Protección Social y de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial en la resolución 2115 del 2007 establece que el valor máximo aceptable para el mercurio es de 0,001 ppm en el agua para consumo Humano [8].

4. MARCO TEORICO

4.1. Características generales del agua

El agua es uno de los principales componentes del planeta tierra; alrededor del 98%, corresponde a agua salada que se encuentra en mares y océanos; el agua dulce que poseemos en un 69% corresponde a agua atrapada en glaciares y nieves, un 30% está constituida por aguas subterráneas y una cantidad no superior al 0,7% se encuentra en forma de ríos y lagos.

El agua es una molécula simple y extraña, puede ser considerada como el líquido de la vida. Es la sustancia más abundante en la biosfera, dónde la encontramos en sus tres estados y es además el componente mayoritario de los seres vivos, pues entre el 65 y el 95% del peso de la mayor parte de las formas vivas es agua.

El agua fue además el soporte donde surgió la vida. Posee un extraño comportamiento, que la convierte en una sustancia diferente a la mayoría de los líquidos, manifiesta extraordinarias propiedades físicas y químicas que van a ser responsables de su importancia biológica. Durante la evolución de la vida, los organismos se han adaptado al ambiente acuoso y han desarrollado sistemas que les permiten aprovechar las propiedades del agua. [9]

4.1.1. Propiedades físicas del agua

4.1.1.1. Acción disolvente

El agua es el líquido que más sustancias disuelve, por eso decimos que es el disolvente universal. Esta propiedad, tal vez la más importante para la vida, se debe a su capacidad para formar puentes de hidrógeno con otras sustancias que pueden presentar grupos polares o con carga iónica (alcoholes, azúcares con grupos R-OH, aminoácidos y proteínas con grupos que presentan cargas + y -), lo que da lugar a disoluciones moleculares. También las moléculas de agua pueden disolver a sustancias salinas que se disocian formando disoluciones iónicas. En el caso de las disoluciones iónicas los iones de las sales son atraídos por los dipolos

del agua, quedando "atrapados" y recubiertos de moléculas de agua en forma de iones hidratados o solvatados. [9]

4.1.1.2. Fuerza de cohesión

Los puentes de hidrógeno mantienen las moléculas de agua fuertemente unidas, formando una estructura compacta que la convierte en un líquido casi incompresible. Al no poder comprimirse puede funcionar en algunos animales como un esqueleto hidrostático. [9]

4.1.1.3. Fuerza de adhesión

Esta fuerza está también en relación con los puentes de hidrógeno que se establecen entre las moléculas de agua y otras moléculas polares y es responsable, junto con la cohesión del llamado fenómeno de la capilaridad. [9]

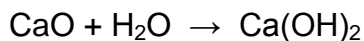
4.1.1.4. Calor de vaporización

Sirve el mismo razonamiento, también los puentes de hidrógeno son los responsables de esta propiedad. Para evaporar el agua, primero hay que romper los puentes y posteriormente dotar a las moléculas de agua de la suficiente energía cinética para pasar de la fase líquida a la gaseosa. [9]

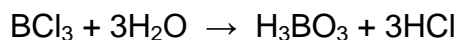
4.1.2. Propiedades químicas del agua

Las reacciones químicas que se presentan en el agua, son fundamentalmente, de tres tipos: reacciones de oxidación-reducción, de ácido-base y de complejación. Estos procesos son los que, en último término, definen la composición química de las aguas. El agua no es un agente oxidante fuerte, aunque puede acentuar la acción oxidante de otros agentes, especialmente la del oxígeno. Es menos eficiente como agente reductor que como oxidante. Una de las pocas sustancias que reduce rápidamente es el flúor.

Las sustancias con carácter básico o ácido fuerte reaccionan con el agua. Por ejemplo, el óxido de calcio, un óxido básico, reacciona con el agua para formar hidróxido de calcio:



Otro tipo de sustancia, con carácter ácido fuerte, es el ácido clorhídrico. Un ejemplo y su reacción con agua es el tricloruro de boro, llamada hidrólisis:



El agua reacciona también con diversas sustancias para formar compuestos sólidos en que la molécula de agua está intacta, pero se convierte en parte de la estructura del sólido. Estos compuestos se llaman hidratos. [9]

4.2. Características de las Fuentes comunes de agua

- Pozos profundos: Normalmente son la mejor fuente de agua. Los problemas comunes que presentan son elevados niveles de hierro, manganeso y dureza.
- Pozos poco profundos: Cercanos a cursos de aguas superficiales; los acuíferos de arena actúan como un filtro efectivo en la remoción de materia orgánica y de microorganismos.
- Ríos: La calidad del agua depende del carácter de cuenca que drena, su grado de contaminación, la estación climática del año, y las condiciones climáticas diarias. Normalmente requiere el tratamiento más extenso y la mayor flexibilidad operacional que ninguna otra fuente.
- Lagos y embalses: La calidad del agua depende del tamaño, profundidad, clima, hoya, grado de eutrofización. Es una fuente de agua mejor que el río debido a que se facilita la auto purificación, en términos de reducción de turbidez, coliformes y color, además de la eliminación de grandes variaciones diarias en calidad. [9]

4.3. Metales presentes en el agua

Los metales presentes en el agua son diversos y generalmente contaminan los cuerpos de agua por la actividad humana, causando graves estragos al medio

ambiente y a la población en general, disminuyendo la ya reducida cantidad de agua para consumo humano ya existente.

Las aguas procedentes de las industrias como la minería, la de recubrimientos metálicos, las fundidoras y otras más, contaminan el agua con diversos metales. Por ejemplo las sales de metales como el zinc, el mercurio, la plata y el cadmio son muy tóxicas para la flora y fauna terrestres y acuáticas.

Las sales solubles en agua de los metales pesados son muy tóxicas y acumulables por los organismos que las absorben, los cuales a su vez son fuente de contaminación de las cadenas alimenticias al ser ingeridos por uno de sus eslabones dentro de los cuales podría estar el hombre (procesos de bioacumulación y biomagnificación). [10]

4.4 Mercurio

4.4.1. Generalidades

El mercurio se genera de manera natural en el medio ambiente y se da en una gran variedad de formas. Al igual que el plomo y el cadmio, el mercurio es un elemento constitutivo de la tierra, un metal pesado. En su forma pura se le conoce como mercurio "elemental" o "metálico" (representado también como Hg (0) o Hg^0). Rara vez se le encuentra en su forma pura, como metal líquido; es más común en compuestos y sales inorgánicas. El mercurio puede enlazarse con otros compuestos como mercurio monovalente o divalente (representado como Hg (I) y Hg (II) o Hg^{1+} y Hg^{2+}). A partir del Hg (II) se pueden formar muchos compuestos orgánicos e inorgánicos de mercurio.

El mercurio elemental es un metal blanco plateado brillante, en estado líquido a temperatura ambiente, que normalmente se utiliza en termómetros y en algunos interruptores eléctricos. A temperatura ambiente, y si no está encapsulado, el mercurio metálico se evapora parcialmente, formando vapores de mercurio. Los vapores de mercurio son incoloros e inodoros. Cuanto más alta sea la temperatura, más vapores emanarán del mercurio metálico líquido. Algunas

personas que han inhalado vapores de mercurio indican haber percibido un sabor metálico en la boca.

El mercurio se extrae como sulfuro de mercurio (mineral de cinabrio). A lo largo de la historia, los yacimientos de cinabrio han sido la fuente mineral para la extracción comercial de mercurio metálico. La forma metálica se refina a partir del mineral de sulfuro de mercurio calentando el mineral a temperaturas superiores a los 540 °C. De esta manera se vaporiza el mercurio contenido en el mineral, y luego se captan y enfrían los vapores para formar el mercurio metálico líquido.

Algunos de los compuestos inorgánicos de mercurio son: sulfuro de mercurio (HgS), óxido de mercurio (HgO) y cloruro de mercurio (HgCl_2). A estos compuestos también se les conoce como sales de mercurio. La mayoría de los compuestos inorgánicos de mercurio son polvos o cristales blancos, excepto el sulfuro de mercurio, que es rojo y se vuelve negro con la exposición a la luz. Algunas sales de mercurio (como el HgCl_2) son lo bastante volátiles para existir como gas atmosférico. Sin embargo, la solubilidad en agua y reactividad química de estos gases inorgánicos (o divalentes) de mercurio hacen que su deposición de la atmósfera sea mucho más rápida que la del mercurio elemental. Esto significa que la vida atmosférica de los gases de mercurio divalentes es mucho más corta que la del gas de mercurio elemental.

Cuando el mercurio se combina con carbono se forman compuestos conocidos como compuestos "orgánicos" de mercurio u organomercuriales. Existe una gran cantidad de compuestos orgánicos de mercurio (como el dimetilmercurio, fenilmercurio, etilmercurio y metilmercurio), pero el más conocido de todos es el metilmercurio. Al igual que los compuestos inorgánicos de mercurio, el metilmercurio y el fenilmercurio existen como "sales" (por ejemplo, cloruro de metilmercurio o acetato de fenilmercurio). Cuando son puros, casi todos los tipos de metilmercurio y fenilmercurio son sólidos blancos y cristalinos. En cambio, el dimetilmercurio es un líquido incoloro. [1]

4.4.2 Mercurio en el medio ambiente

Varias formas de mercurio se dan de manera natural en el medio ambiente. Las formas naturales de mercurio más comunes en el medio ambiente son el mercurio metálico, sulfuro de mercurio, cloruro de mercurio y metilmercurio. Ciertos microorganismos y procesos naturales pueden hacer que el mercurio en el medio ambiente pase de una forma a otra.

El mercurio elemental en la atmósfera puede transformarse en formas inorgánicas de mercurio, lo que abre una significativa vía para la sedimentación de mercurio elemental emitido.

El compuesto orgánico de mercurio más común que generan los microorganismos y procesos naturales a partir de otras formas es el metilmercurio. El metilmercurio es particularmente inquietante porque puede acumularse (bioacumulación y biomagnificación) en muchos peces de agua dulce y salada comestibles, así como en mamíferos marinos comestibles, en concentraciones miles de veces mayores que las de las aguas circundantes.

Por tratarse de un elemento, el mercurio no se puede descomponer ni degradar en sustancias inofensivas. Durante su ciclo, el mercurio puede cambiar de estado y especie, pero su forma más simple es el mercurio elemental, de suyo nocivo para los seres humanos y el medio ambiente. Una vez liberado a partir de los minerales, o depósitos de combustibles fósiles y minerales yacientes en la corteza terrestre, y emitido a la biosfera, el mercurio puede tener una gran movilidad y circular entre la superficie terrestre y la atmósfera. Los suelos superficiales de la tierra, las aguas y los sedimentos de fondo se consideran los principales depósitos biosféricos de mercurio. [1]

En condiciones naturales, el mercurio se da en alguno de los siguientes estados:

- Como vapor metálico y mercurio líquido/elemental
- Unido a minerales que contienen mercurio (sólido)

- Como iones en solución o unido a compuestos iónicos (sales inorgánicas y orgánicas)
- Como complejos iónicos solubles
- Como compuestos orgánicos no iónicos gaseosos o disueltos
- Unido a partículas o materia orgánica o inorgánica mediante adsorción iónica, electrofílica o lipofílica.

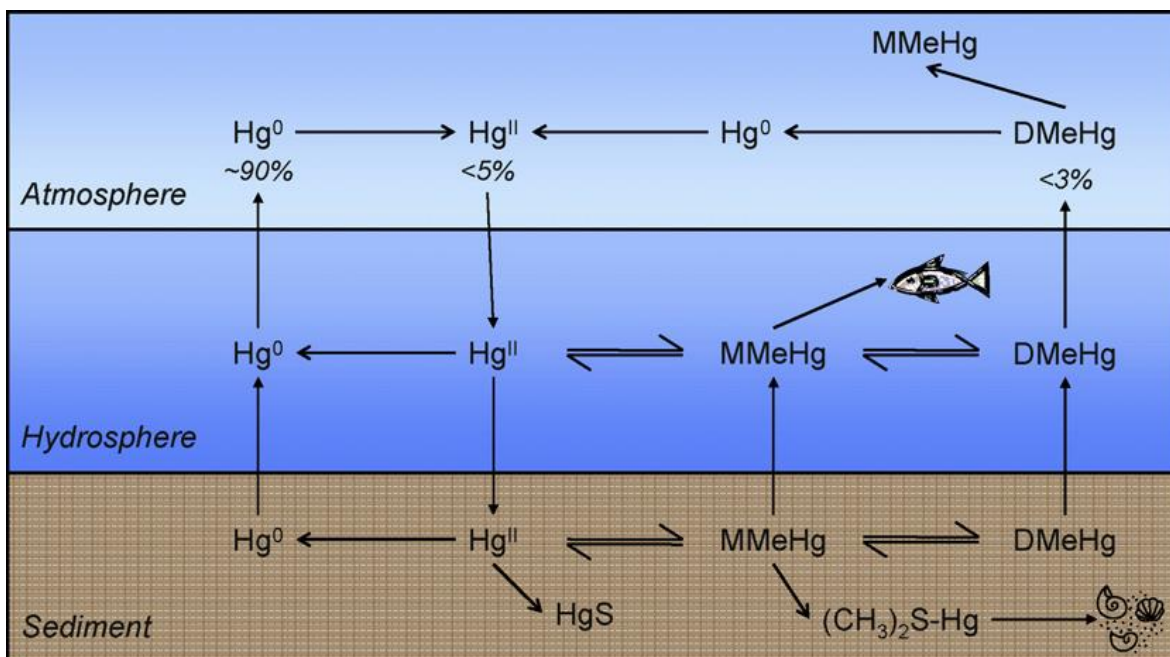


Fig. 1. Ciclo Biogeoquímico del Mercurio. [13]

4.4.3. Efectos sobre la salud

4.4.3.1. Metilmercurio

Entre los compuestos orgánicos de mercurio, el metilmercurio ocupa un lugar especial porque mucha población está expuesta a él, y su toxicidad está mejor caracterizada que la de otros compuestos orgánicos de mercurio. Se considera que, dentro del grupo de los compuestos orgánicos de mercurio, los compuestos de alquilmercurio (en particular, etilmercurio y metilmercurio) son similares en cuanto a toxicidad (además, ambos han sido utilizados como plaguicidas). En cambio, otros compuestos orgánicos de mercurio, como el fenilmercurio, se asemejan más al mercurio inorgánico en lo que respecta a toxicidad.

El metilmercurio es un neurotóxico muy bien documentado, que puede provocar efectos perjudiciales particularmente en el cerebro en formación. Además, este compuesto traspasa con facilidad la barrera placentaria y la barrera hematoencefálica; por eso es muy preocupante la exposición durante el embarazo. Asimismo, algunos estudios indican que incluso un pequeño aumento en la exposición al metilmercurio puede causar efectos perjudiciales en el sistema cardiovascular y un incremento en la mortalidad. Considerando la importancia de las enfermedades cardiovasculares en todo el mundo, estos resultados, aunque no estén confirmados, sugieren que las exposiciones al metilmercurio requieren más atención y un seguimiento adicional. Además, basándose en su evaluación general, el Centro Internacional de Investigación sobre el Cáncer (International Agency for Research on Cancer, IARC, 1993) considera que los compuestos de metilmercurio pueden ser carcinógenos para los seres humanos (grupo 2B).

El metilmercurio puede formarse en el medio ambiente por metabolismo microbico (procesos bióticos), por ejemplo, por efecto de ciertas bacterias, así como por procesos químicos que no implican a organismos vivos (procesos abióticos). Sin embargo, se suele considerar que su formación en la naturaleza se debe sobre todo a procesos bióticos. En la actualidad no se conocen fuentes antropógenas (generadas por seres humanos) directas de metilmercurio, aunque antiguamente las hubo. Sin embargo, y de forma indirecta, las liberaciones antropógenas contribuyen a los niveles de metilmercurio en el medio ambiente por su transformación a partir de otras formas. Un ejemplo de liberación directa de compuestos orgánicos de mercurio es el caso de envenenamiento por metilmercurio en Minamata en los años 1950, cuando se vertieron en esa bahía subproductos orgánicos de mercurio resultado de la producción industrial de acetaldehído. También se conocen casos de envenenamiento en Irak debido a que las semillas de trigo utilizado para preparar pan habían sido tratadas con recubrimiento fitosanitario a base de compuestos inorgánicos de mercurio. Hay, además, investigaciones recientes que demuestran que en los vertederos de desechos urbanos (Lindberg et al., 2001) y las plantas de tratamiento de aguas residuales (Sommar et al, 1999) pueden ocurrir liberaciones directas de

metilmercurio, pero no se puede determinar todavía la importancia general de esta fuente. [1]

4.4.3.2. Mercurio Elemental

La vía principal de exposición al mercurio elemental es por inhalación de sus vapores. Cerca del 80% de los vapores inhalados es absorbido por los tejidos pulmonares. Este vapor también penetra con facilidad la barrera de sangre del cerebro y su neurotoxicidad está bien documentada. La absorción intestinal de mercurio elemental es baja. El mercurio elemental puede oxidarse en los tejidos corporales a la forma divalente inorgánica.

Se han observado trastornos neurológicos y de comportamiento en seres humanos tras inhalación de vapor de mercurio elemental. Algunos de los síntomas son: temblores, labilidad emocional, insomnio, pérdida de la memoria, cambios en el sistema neuromuscular y dolores de cabeza. Se han observado asimismo efectos en el riñón y la tiroides. Las exposiciones altas también han ocasionado mortalidad. En cuanto a carcinogenicidad, la evaluación general del IARC (1993) concluye que el mercurio metálico y los compuestos inorgánicos de mercurio no son clasificables en cuanto a carcinogenicidad para los seres humanos (grupo 3). Por consiguiente, los efectos neurotóxicos, como la inducción de temblores, podrían constituir el efecto crítico que sirva de base para la evaluación de riesgos. También deberían considerarse los efectos en riñones (conducto renal), pues son el punto de destino crítico en lo que a exposición a compuestos inorgánicos de mercurio se refiere. Puede que el efecto sea reversible, pero como la exposición de la población general tiende a ser continua, el efecto puede seguir siendo relevante. [1]

4.5. Determinación de metales.

Para la determinación de metales en aguas tratadas y crudas se encuentran en la literatura muchos métodos desde los más básicos y simples como las volumetrías y las gravimetrías hasta los más complejos como los fotométricos tanto de

absorción como los de emisión; en este trabajo se profundizará en el análisis de mercurio por absorción atómica acoplado a un generador de vapor frío.

4.6. Método de análisis de mercurio en agua y pescados

Puesto que el contenido de mercurio en aguas tanto potables como crudas y en pescados se encuentra generalmente en niveles de concentración de partes por billón, ha sido necesario desarrollar métodos analíticos con precisión y exactitud que fueran lo suficientemente sensibles como para permitir su análisis a dichas concentraciones.

El método más utilizado para el análisis de mercurio en agua y pescados es el de absorción atómica-vapor frío que permite realizar análisis de mercurio con límites de detección de 1 ppb. [5]

4.7. Espectrofotometría de absorción atómica-vapor frío para el análisis de mercurio.

La espectrofotometría de absorción atómica por llama directa (FAA), es una técnica analítica que permite detección y la cuantificación de metales en solución. Esta técnica está indicada para determinar elementos alcalinos, alcalinotérreos y metales pesados presentes en cualquier tipo de muestra susceptible de ser disuelta.

La espectrofotometría de absorción atómica está fundamentada en la capacidad que tienen los elementos, en su estado atómico basal, de absorber radiación electromagnética a longitudes de onda específicas para cada elemento. La cantidad de energía absorbida es directamente proporcional a la concentración de los átomos del metal analizado, de acuerdo con la Ley de Lambert-Beer. Los límites de detección logrados son del orden de ppm (partes por millón).

En esta técnica, los metales disueltos son llevados a su forma atómica elemental mediante calentamiento por una llama generada por una mezcla de gases combustibles. Las mezclas más empleadas son: aire-acetileno y óxido nitroso-acetileno. Las temperaturas de la llama van de 1900 °C a 2800 °C.

Los átomos en forma de nube gaseosa, son irradiados por un haz de luz de una longitud de onda específica, de acuerdo con el metal analizado; esto se logra mediante el empleo de lámparas con cátodo del metal de interés o con lámparas de descarga sin electrodo. Los átomos absorben una fracción de la radiación proveniente de la lámpara y la fracción restante es captada por un fotodetector y un dispositivo transductor, que la convierten en una señal eléctrica, que posteriormente es registrada por un software.

Como se mencionó anteriormente, el valor de señal obtenido es proporcional a la concentración de los átomos presentes en la nube de gases; de este modo es posible construir una curva de calibración analizando soluciones patrón de concentración conocida y midiendo la magnitud de la absorción de cada una de ellas.

Un caso particular en la técnica de absorción atómica lo constituye el mercurio, ya que gracias a su volatilidad, no requiere el uso de llama para atomizarse y puede determinarse en forma de vapor frío. Mediante esta técnica se alcanzan límites de detección del orden de 1 ppb.

La determinación se realiza adicionando un agente reductor (cloruro estañoso o borohidruro de sodio), al digerido. La reacción del mercurio en solución con el agente reductor produce mercurio atómico muy volátil.

El vapor de mercurio es conducido hacia una celda colocada en el paso del haz de luz, donde ocurre la interacción entre los átomos de mercurio y la radiación, produciéndose la absorción. [5]

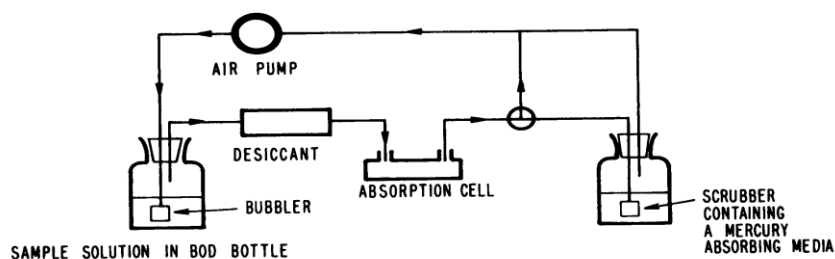


Fig. 2 Esquema de generador de vapor frío.

4.8 Interferencias en el análisis de mercurio por absorción atómica-vapor frio

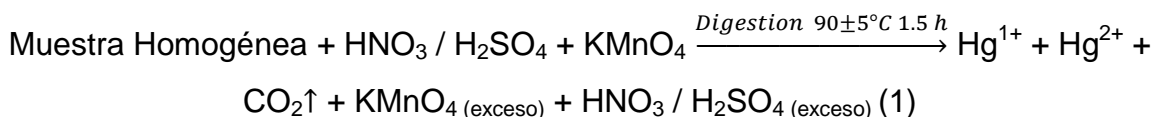
- Los compuestos orgánicos no degradados completamente pueden absorben a las mismas longitudes de onda de algunos metales, causando interferencias espectrales. Para evitar esto, se debe asegurar una digestión completa de la muestra.
- Concentraciones altas de sólidos disueltos en el digerido pueden causar interferencias de matriz, debido a la diferencia de viscosidad entre éste y las soluciones patrón. Se debe tratar de asemejar, en lo posible, la matriz del digerido y de los patrones.
- Concentraciones altas (mayores a 20 mg/Kg), en sulfuros interfieren en la recuperación del mercurio inorgánico. El sulfuro oxida al ion estañoso.
- La presencia de concentraciones altas de cloruros causa interferencia ya que este anión absorbe a la misma longitud de onda del mercurio.
- El material sucio o contaminado es una de las mayores fuentes de interferencia, por lo cual se debe tener especial cuidado en el lavado.
- Altas concentraciones (mayores a 1000 mg/L) de cobalto, cobre, hierro, mercurio, y níquel causan precipitados en el momento de la reducción. [5]

4.9. Preparación de la muestra para el análisis de mercurio por absorción atómica-vapor frio

4.9.1 Destrucción de la materia orgánica en la muestra

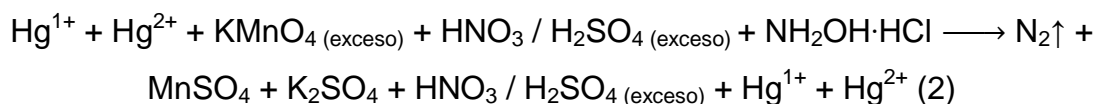
La determinación del contenido total de mercurio en aguas crudas y potables y en pescados involucra la destrucción total de la muestra, con el fin de lograr la disolución del metal que posteriormente será cuantificado mediante esta técnica.

La digestión abierta de la muestra para la disolución del mercurio, debe realizarse bajo condiciones controladas debido a la volatilidad de dicho elemento, Usualmente se emplean mezclas de ácidos combinadas con permanganato de potasio y con calentamiento en baño maría, como se muestra en las siguientes reacciones: [5]



4.9.2. Destrucción del color en la matriz digerida

El color es uno de los factores que genera interferencias a la hora de analizar mercurio por la técnica de absorción atómica vapor frío, por esto es necesario hacer reaccionar el permanganato de potasio en exceso en el vial de reacción con una solución de cloruro de hidroxilamina para formar una sal soluble y que desaparezca el color morado característico del permanganato.



4.10. Otras técnicas de análisis de mercurio en Aguas.

Pre-Tratamiento	Pre-Concentración	Separación	Detección y Cuantificación
Extracción (Líquido-líquido; micro-extracción en fase sólida) Derivatización (Generación de hidruros; alquilación). Generación de vapor frío (Química; ultrasonido). Destilación Reducción Selectivas (Descomposición Complejo-métrica)	Micro-extracción en fase sólida	HPLC	Espectroscopia de Emisión atómica acoplado a inductor de plasma
		GC	Espectroscopia de Emisión atómica, inducida por plasma de microondas
	Amalgamación	Electroforesis Capilar	Espectrometría de masas acoplado a inductor de plasma
		Técnicas basadas en diferentes propiedades químicas y físicas	Espectrometría de masas con dilución de isotopos acoplado a inductor de plasma
	Captura criogénica		Espectrofotometría de Fluorescencia Atómica
			Espectrofotometría de Absorción Atómica con horno de Cuarzo
		Espectrofotometría de absorción Atómica con horno de Grafito	

Tabla 1. Técnicas generales para el análisis de mercurio en aguas y especies [13].

4.11. Normatividad

En Colombia la norma estipulada para la calidad del Agua está regida por la Resolución 2115, en la cual se señalan características, instrumentos básicos y frecuencias del sistema de control y vigilancia para la calidad del agua para consumo humano. [8]

Artículo 5° Características Químicas que tienen reconocido efecto adverso en la salud humana

Elementos, compuestos químicos y mezclas de compuestos químicos diferentes a los plaguicidas y otras sustancias	Expresados como	Valor máximo aceptable (mg/L)
Mercurio	Hg	0,001

Tabla 2. Valor aceptable para el mercurio según resolución 2115.

En Colombia el Ministro de la Protección Social, en la resolución 0670 del 2007 establece el reglamento técnico de emergencia sobre los requisitos fisicoquímicos y microbiológicos que deben cumplir los productos de la pesca, en particular pescados, moluscos y crustáceos para el consumo humano, en el capítulo 2 establece que para el mercurio el límite máximo es: 0.5 mg/kg para otras especies de la pesca y 1 mg/kg para el bonito y atún [15].

4.12. Acreditación en Colombia.

La acreditación, según el decreto 2269/93 es el proceso mediante el cual se reconoce la competencia técnica y la idoneidad de organismos de certificación e inspección, laboratorios de ensayo y metrología.

Las ventajas para los laboratorios que se encuentran acreditados son:

- Se evidencia el cumplimiento de condiciones de seguridad y calidad dentro del mercado,
- Facilita un comercio ágil y con menores costos de transacción,
- Muestra competitividad, seguridad en los productos ofrecidos y se abre al comercio internacional, ciencia y tecnología.

El papel de la acreditación es el de otorgar confianza a los resultados de evaluación de la conformidad respecto del cumplimiento de normas técnicas o reglamentos técnicos, basándose principalmente en los procedimientos aceptados globalmente y la verificación de las condiciones de aseguramiento metrológico.

El proceso de acreditación es confiable puesto que es el resultado de un proceso global de definición de los requisitos, tanto de la actividad de acreditación y de los organismos que la desarrollan como de cada uno de los tipos de organismos de evaluación de la conformidad que sean acreditables.

Confianza en la acreditación:

- Competencia técnica
- Independencia e imparcialidad
- Procedimientos globalmente aceptados
- Esquema de vigilancia
- Evaluación por pares / Reconocimiento internacional

La acreditación se debe realizar de conformidad con la norma NTC ISO/IEC 17011, aplicable al organismo de acreditación y de acuerdo con las normas técnicas para cada una de las modalidades de organismos de evaluación. El laboratorio de análisis de aguas y alimentos de la Universidad Tecnológica de Pereira, se encuentra clasificado dentro de los laboratorios de ensayo o prueba, los cuales deben cumplir con la norma ISO/IEC 17025:1995.

Los aspectos que se evalúan en el proceso de acreditación son:

Organización: existencia legal, imparcialidad.

Competencia técnica: recurso humano, recursos documentales, trazabilidad y atestación.

Sistema de gestión: manual de calidad, procedimientos, documentos. [11]

4.13. Fundamentación estadística

4.13.1. Metodología de validación

La validación es un proceso para establecer las características y limitaciones de un método analítico y para identificar las influencias que pueden modificar esas características y en qué medida. La validación de un método de ensayo es la demostración que un método de ensayo es apto para un uso previsto.

Por lo general en la validación de los métodos analíticos, se busca la obtención de datos para determinar: precisión, exactitud, linealidad, límite de detección, robustez y selectividad/especificidad, parámetros que ayudan a identificar errores aleatorios y sistemáticos dentro de la metodología de ensayo.

4.13.1.1. Precisión

Las medidas de la precisión incluyen:

- La desviación estándar de la repetibilidad (S_r), obtenida al observar la variabilidad al interior del laboratorio, con el mismo analista y bajo las mismas condiciones del ensayo.
- La desviación estándar de la reproducibilidad (S_R): se puede determinar por la variación de los resultados en las pruebas inter-laboratorio.
- La desviación estándar de la precisión intermedia (S_{zi}), donde se varían algunos factores (i), como: analistas, tiempos de ensayo, equipos y en general variando características del método.

Para determinar la precisión es la medida de cuan cerca o dispersos están los resultados unos de otros, y se expresa normalmente como la desviación estándar o desviación estándar relativa (RSD) ya que se acepta la varianza como el mejor indicador de la dispersión. A menor varianza, mayor precisión. Las medidas más comunes de la precisión son repetibilidad y reproducibilidad.

Desviación estándar:

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}{N - 1}}$$

Desviación estándar relativa (coeficiente de variación %CV):

$$\text{RSD} = (s/\bar{x}) \times 100$$

4.13.1.2. Exactitud

La exactitud del método es usualmente determinada mediante material de referencia (reactivos calidad certipur, suprapur, balanzas calibradas y en general equipos calibrados), el cual se usa dentro del ensayo para observar el porcentaje de error en la prueba.

La veracidad del método es una expresión de cuan cerca a la media de un conjunto de resultados del valor verdadero, la veracidad se expresa normalmente en términos del sesgo o error relativo, el cálculo del sesgo para medidas cualitativas puede hacerse de diferentes maneras:

Utilizando materiales de referencia certificados, para esto existen dos formas comparando con materiales de referencia certificados, o con los resultados obtenidos por un método estándar, los valores de referencia deben ser trazables al SI.

Mediante la utilización de las muestras de desempeño de los ejercicios interlaboratorios

La veracidad será reportada como

$$\%e = \frac{|x_i - \bar{x}|}{x_i} * 100$$

Donde x_i es el valor verdadero

4.13.1.3. Linealidad

Define la habilidad del método para obtener resultados de la prueba proporcionales a la concentración del analito.

Para calcularlo en determinaciones cuantitativas se pueden tomar las siguientes consideraciones:

- Preparar blanco más estándares de referencia, al menos seis valores
- Graficar la respuesta de medición (eje y) contra la concentración de mensurando (eje x)
- Visualmente se puede examinar el intervalo de trabajo lineal aproximado y los límites superior e inferior.
- Una vez determinado los límites de linealidad, se leen estándares de referencia dentro del rango de linealidad.
- Calcule el coeficiente apropiado de regresión (r),

$$r = \frac{\sum x_i y_i - (\sum x_i)(\sum y_i)/N}{\sqrt{[\sum x_i^2 - (\sum x_i)^2/N][\sum y_i^2 - (\sum y_i)^2/N]}}$$

- Grafique la respuesta de medición contra la concentración del mensurando, visualmente examine para identificar los valores aberrantes, los cuales no pueden estar reflejados en la regresión.

La relación entre la respuesta del instrumento y la concentración no tiene que ser necesariamente lineal para que el método sea efectivo, pero la curva debe ser repetible de un día a otro.

Otra forma de realizar la verificación de linealidad, es mediante la prueba de hipótesis, utilizando el coeficiente de correlación esta permite decidir con cierto riesgo de error cuál de las hipótesis es la verdadera.

La hipótesis nula se designa por H_0 y es la que se debe probar o contrastar, la hipótesis alternativa es la complementaria y se designa por H_i , esta hipótesis no se

somete directamente a la prueba pero es la más verosímil cuando la prueba estadística nos conduce a rechazar la hipótesis nula.

H_0 : No existe correlación entre los valores de X y Y

H_i : Existe correlación ente los valores de X y Y

Bajo la hipótesis nula H_0 :

$$t_{(N-2)} = \frac{r\sqrt{(n-2)}}{\sqrt{(1-r^2)}}$$

Sigue una distribución t de Student con n-2 grados de libertad.

H_0 se acepta $t = \frac{|r|\sqrt{(n-2)}}{\sqrt{(1-r^2)}} > t$ de tablas con n-2 grados de libertad

Otra forma es determinando el nivel de significación p para poder rechazar H_0 (probabilidad de que, si no hay correlación, se obtenga un valor de r igual o mayor al observado).

4.13.1.4. Limite de Detección

Este permite establecer cuál es la menor concentración dentro del rango operacional del método.

Para calcularlo en determinaciones cuantitativas se pueden tomar las siguientes consideraciones:

Se toman 10 réplicas del blanco (B) y se evalúa la desviación estándar (s_B), expresándose el LD como el valor promedio de la señal del blanco + $3,3 s_B$

$$LD = B + 3,3 s_B$$

Cuando no hay señal se tomara un blanco fortificado (en baja concentración) Se toman 10 réplicas del blanco fortificado (BF) y se evalúa la desviación estándar (s_{BF}), expresándose el LD como cero + $3,3 s_{BF}$.

$$LD = 0 + 3,3 s_{BF}$$

4.13.1.5. Límite de Cuantificación

El límite de cuantificación es estrictamente la menor concentración de analito que puede ser determinada con un aceptable nivel de repetibilidad y exactitud.

Para hallar el límite de cuantificación:

Se toman 10 réplicas del blanco (B) y se evalúa la desviación estándar (s_B), expresándose el LQ como el valor promedio de la señal del blanco + cinco, seis O diez s_B

$$LC = B + 5, 6 \text{ O } 10 s_B .$$

Cuando no hay señal se tomara un blanco fortificado (en baja concentración) Se toman 10 réplicas del blanco fortificado (BF) y se evalúa la desviación estándar (s_{BF}), expresándose el LD como cero + diez s_{BF} .

$$LC = 0 + 10 s_{BF}$$

4.13.1.6. Robustez

Dentro de esta característica del método se debe comparar el efecto del cambio en uno o más parámetros del método, para establecer por ejemplo, rangos de operación o de medición.

Para calcularlo en determinaciones cuantitativas se pueden tomar las siguientes consideraciones:

Identificar las variables que puedan tener un efecto significativo en el desempeño del método, establecer experimentos para observar el efecto sobre la exactitud y la precisión de variables que se van cambiando sistemáticamente, se determinaran los efectos de cada cambio sobre las condiciones de medida, de ser posible se diseñaran controles de calidad para las variables críticas.

Se puede utilizar el análisis de varianza ANOVA de las herramientas de Excel, mediante el uso de la aplicación Datos análisis de datos, análisis de varianza de un factor, la cual es utilizada para aislar y estimar las varianzas que contribuyan

para el error total de un experimento, para analizar si hay o no diferencia entre los lotes de análisis.

Dada una serie de datos

REPLICAS	LOTES					
	1	2	3	4	5	6
1	X_{12}	X_{13}	X_{14}	X_{15}	X_{16}	X_{12}
2	X_{21}	X_{22}	X_{23}	X_{24}	X_{25}	X_{26}

Se acepta que cualquier valor x_{ij} es la combinación de tres componentes:

$$X_{ij} = \mu + Li + e_{ij}$$

μ = valor real (desconocido)

Li = efecto de las condiciones propias del lote, L (desconocido)

e_{ij} = error experimental (desconocido)

μ = se estima por la media general de todos los datos x_{prom}

Li = se estima por la diferencia entre la media del lote $x_{i_{prom}}$ y la media general x_{prom}

$$(Li = x_{i_{prom}} - x_{prom})$$

e_{ij} = se estima por la diferencia entre el valor x_{ij} , y la media del lote, $x_{i_{prom}}$

$$e_{ij} = (x_{ij} - x_{i_{prom}})$$

$$(x_{ij} - x_{i_{prom}}) = (x_{i_{prom}} - x_{prom}) + (x_{ij} - x_{i_{prom}})$$

Las desviaciones individuales se cancelarían en las sumas, debido a los valores positivos y negativos de igual magnitud; esto se evita elevándolos al cuadrado:

$$\sum \sum (x_{ij} - x_{prom})^2 = \sum (x_{i prom} - x_{prom})^2 n_i + \sum (x_{ij} - x_{i prom})^2 \quad SQ_o = \sum_{i=1}^k S_i^2 (n_i - 1)$$

Suma de los cuadrados
Totales: SQ_t

Suma de los cuadrados
de lotes: SQ_1

Suma de los cuadrados
residual SQ_o

Grados de libertad:

a) total, $N_t = m \cdot n - 1$ $m = n^\circ$ de lotes (6)

b) lotes, $N_1 = m - 1$ $n = n^\circ$ de repetición de análisis (2)

c) residual, $N_o = m (n - 1)$

Interpretación de una tabla de ANOVA:

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios
Entre lotes SQ_1	$\sum (x_{i prom} - x_{prom})^2 n_i$	$N_1 = m-1$	$M_1 = SQ_1 / N_1$
Dentro del lote SQ_o	$\sum (x_{ij} - x_{i prom})^2$	$N_o = m(n-1)$	$M_o = SQ_o / N_o$
Total $SQ_o = \sum_{i=1}^k S_i^2 (n_i - 1)$	$\sum (x_{ij} - x_{prom})^2$	$N_t = N_1 + N_o$	

La comparación entre M_1 y M_o , que son los cuadrados medios entre lotes y dentro del lote se efectúa por la prueba "F".

$$F \text{ calculado} = M_1/M_0$$

Los cuadrados medios M_1 y M_0 se deben comparar para determinar si M_1 es significativamente mayor que M_0 , por ejemplo, para ver si hay una fuente de error estadísticamente significativa entre los lotes.

Lo normal es que M_1 sea mayor que M_0 , ya que de lo contrario el método y la técnica deben ser examinados rigurosamente para detectar cualquier fuente anormal de error. El valor de F debe ser siempre mayor que 1, por definición, o sea que si M_1 fuera menor que M_0 , debe invertirse el orden de la formula anterior.

El test F es indicativo de si hay o no evidencia de diferencias significativas entre lotes y dentro de los lotes. Si es F calculado es menor a F teórico, todo este procedimiento de cálculo no es aplicable.

La planilla Excel dispone de una Herramienta que es el Análisis de Varianza. Para ello, en Herramientas y Análisis de Datos, debe buscarse Análisis de Varianza de un Factor. En rango de entrada se debe seleccionar la matriz de datos correspondiente a las dos filas y a las seis columnas de la Tabla Anterior. Se debe seleccionar agrupamiento por columnas, un valor de alfa de 0,005(requisito para el test F) y en opciones de salida, que la presentación de los resultados sea en una hoja de cálculo nueva.

En la primera columna figura el origen de las variaciones (entre grupos, dentro de grupos y total), en la segunda columna la suma de cuadrados (SQ_1 , SQ_0 y SQ_{total}), en la tercera columna los grados de libertad respectivos, en la cuarta columna los cuadrados medios o el promedio de los cuadrados, en la quinta columna el valor de F calculado, en la sexta columna el valor de probabilidad del test F y en la séptima el valor crítico para el test F . Debe recordarse que este valor crítico debe ser mayor que el valor de F calculado.

4.13.1.7. Selectividad/ Especificidad

La selectividad suele ser el término para determinar con exactitud un analito en presencia de dos o tres componentes en una matriz dada, la selectividad se

evalúa en forma práctica estudiando las interferencias de mayor potencialidad a partir del conocimiento de la composición promedio de la matriz.

La selectividad de un método se investiga usualmente estudiando su habilidad de medir el analito de interés en una muestra a la que se han añadido posibles interferencias deliberadamente.

Teniendo las características del método, la validación va a depender, entonces, de la técnica de ensayo escogida para determinar los analitos, de esta forma, los métodos de ensayo se pueden clasificar en gravimétricos, volumétricos, electroquímicos y espectrométricos, los cuales varían en complejidad, debido a la naturaleza del analito a medir.

Para calcularlo en determinaciones cuantitativas se pueden tomar las siguientes consideraciones:

Calcular con base a blancos, o muestras fortificadas en diferentes concentraciones, el porcentaje de recuperación:

$$\% \text{ RECUPERACION} = ((C_1 - C_2) / C_3) * 100$$

Dónde:

C₁= Concentración determinada en la muestra fortificada.

C₂: Concentración determinada en la muestra no fortificada

C₃: Concentración de fortificación.

4.13.1.8. Repetibilidad

Será el grado de concordancia entre los resultados de mediciones sucesivas del mismo mensurando bajo las mismas condiciones de medición (mismo analista mismo método)

Para calcularlo en determinaciones cuantitativas se pueden tomar las siguientes consideraciones:

Prepare estándares de referencia, blancos de muestra, muestras fortificadas a varias concentraciones del intervalo de trabajo, determine la desviación estándar a cada concentración, calcule el % CV para cada concentración, en diferentes días por el mismo analista y equipo.

4.13.1.9. Reproducibilidad

Grado de concordancia entre los resultados de mediciones del mismo mensurando efectuadas bajo condiciones de medición modificadas.

Para calcularlo en determinaciones cuantitativas se pueden tomar las siguientes consideraciones:

Prepare estándares de referencia, blancos de muestra, muestras fortificadas a varias concentraciones del intervalo de trabajo, determine la desviación estándar a cada concentración, calcule el % CV para cada concentración, en diferentes días por diferentes analistas, estándares, instrumentos.

Tanto la repetibilidad como la reproducibilidad suelen depender de la concentración del analito y cuando esto ocurre, esta dependencia debe ser determinada si es significativa, exprese el %CV para cada concentración en estudio. [12]

4.13.2. Metodología de Estandarización

El proceso de estandarización de una técnica de análisis de laboratorio, es menos dispendiosos que el de validación, en este se evalúa la efectividad y repetibilidad del procedimiento utilizado, calculando y analizando los porcentajes de recuperación de muestras contaminadas con una concentración conocida.

4.13.3. Incertidumbre

4.13.3.1. Aspectos generales

El Vocabulario Internacional de Metrología define el error como “la diferencia entre el resultado obtenido y el valor verdadero del mensurando”. La incertidumbre y el error están asociados, ya que la incertidumbre debe considerar todas las posibles

fuentes de error del proceso de medida. De todos modos, hay diferencias entre ambos conceptos.

Puede darse el caso de que un resultado tenga un error despreciable, ya que por casualidad, este resultado puede estar muy próximo al valor verdadero. Además, el error cometido al analizar varias muestras con un método analítico no es siempre el mismo ya que los errores aleatorios hacen que el error cometido en cada uno de los análisis sea diferente.

Sin embargo, la incertidumbre de todos los resultados obtenidos al analizar esa muestra es siempre la misma ya que se utiliza siempre el mismo método analítico. Por tanto, si se calcula la incertidumbre para un método analítico y un tipo de muestras determinado, todos los resultados obtenidos para las mismas muestras de ese tipo que se analicen con ese método tendrán la misma incertidumbre, aunque no tienen por qué tener el mismo error asociado.

La veracidad de un resultado se define como el grado de concordancia entre el valor medio obtenido a partir de una serie de resultados de ensayo y un valor de referencia aceptado. La incertidumbre y la veracidad están muy relacionadas entre sí, ya que si no se ha verificado la veracidad de un resultado, no se puede garantizar que se hayan corregido todos los errores sistemáticos del mismo y, por lo tanto, no es posible asegurar que el intervalo (Valor estimado \pm Incertidumbre) contenga al valor considerado verdadero con una determinada probabilidad.

Al expresar un resultado analítico como (Valor estimado \pm Incertidumbre), el analista debe verificar que el Valor estimado no tiene un error sistemático. Si la veracidad del resultado se ha verificado utilizando un estándar nacional o internacional (CRM, método de referencia, etc.), en ese proceso también se verifica la trazabilidad del resultado frente al estándar utilizado. En este caso, la incertidumbre y la trazabilidad también están relacionadas entre sí.

La incertidumbre debe incluir un término asociado a la precisión intermedia del experimento, y otro término asociado a verificar si el método tiene o no un error

sistemático. Esto hace que la incertidumbre siempre sea mayor que la variabilidad de los resultados debida a la precisión intermedia.

Incertidumbre y precisión de un resultado analítico son términos muy relacionados. Los analistas están acostumbrados a asociar el término precisión a un determinado múltiplo de la desviación estándar o a un intervalo de confianza, resultante de repetir el análisis de la muestra problema.

El concepto de incertidumbre es más global, en el sentido de considerar todas las fuentes posibles de error que intervienen el resultado final. Probablemente la diferencia más importante se encuentra en el hecho de que el concepto de incertidumbre está íntimamente ligado con el concepto de trazabilidad, no así el de precisión, que indica una mera dispersión de los datos. ISO define la incertidumbre como "una estimación unida al resultado de un ensayo que caracteriza el rango de valores dentro de los cuales se afirma que está el valor verdadero". Prácticamente esto nos está diciendo que ya que la estimación de la incertidumbre debe incluir el valor verdadero, no tiene ningún sentido calcular la incertidumbre sin antes haber verificado la trazabilidad del procedimiento analítico, ya que solamente en estas circunstancias podremos asegurar que el valor verdadero cae dentro de nuestra incertidumbre.

4.13.3.2 Cálculo de la incertidumbre mediante el criterio EURACHEM

El método para el cálculo de incertidumbres promovido por la ISO fue primero aplicado a resultados físicos, y posteriormente adaptado al campo de las mediciones químicas por el EURACHEM (CITAC/EURACHEM 2000).

En este enfoque se divide el proceso de medida químico en bloques o pasos, se busca la incertidumbre de cada bloque o paso, y finalmente se combinan para encontrar la incertidumbre total en sus partes fundamentales mediante la identificación, estimación y combinación de todas las fuentes de incertidumbre asociadas con el proceso de medida.

Esta aproximación puede ser usada con métodos clásicos de análisis o bien con otros casos muy simples. Para otras metodologías, las dificultades para establecer

una relación matemática entre los resultados analíticos y los parámetros que intervienen el procedimiento analítico lo hacen muy complejo, y suele ser mejor dividir el proceso de medida en un número de bloques como el muestreo, los pretratamientos de la muestra, la separación del analito, la medida instrumental, los cálculos, etc., en lugar de intentar buscar una expresión algebraica del tipo $y=f(x_i, x_j, x_k, \dots)$.

El procedimiento para cuantificar la incertidumbre total se muestra en el esquema siguiente:

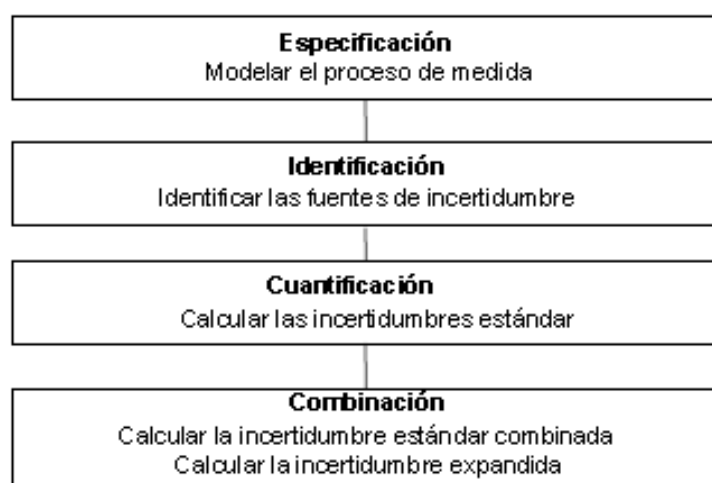


Fig. 3 Esquema para calcular incertidumbre total.

Especificación

Ya que normalmente el resultado de una medida depende de diversos parámetros (otros mensurados que puedan haberse estimado, constantes y otras cantidades), es necesario especificar la relación entre la cantidad medida (y) y estos parámetros (x_i, x_j, x_k, \dots). En lo posible, esta relación debe expresarse como una expresión algebraica del tipo $y = f(x_i, x_j, x_k, \dots)$. Una vez hecho esto, se llevará a cabo la identificación y la cuantificación de las fuentes de incertidumbre de cada bloque, y se calculará la incertidumbre total combinando los valores de las incertidumbres individuales calculadas.

Identificación

Es necesario identificar, a partir del conocimiento del método analítico, todas las fuentes de incertidumbre posibles, independientemente de la importancia que tenga cada una de ellas. Algunos de los ejemplos de las fuentes de incertidumbre en un procedimiento analítico son el muestreo, los pre-tratamientos, el analista, los errores sistemáticos del instrumento, la calibración, la pureza de los reactivos, las condiciones de medida, la contaminación, el pesado, medida de volúmenes (aforos) y los errores computacionales.

Cuantificación

Una vez que se han identificado las fuentes de incertidumbre, se las debe cuantificar. Como no todos los componentes identificados tendrán una contribución significativa en la incertidumbre total, conviene hacer una selección preliminar de los componentes que contribuirán de forma importante, basada en sus incertidumbres individuales.

La cuantificación de los componentes individuales puede hacerse analizando replicados especialmente para este fin, o utilizando datos obtenidos en trabajos anteriores, o usando toda la información que pueda estar disponible en el laboratorio, teniendo en cuenta la experiencia de los analistas.

La cuantificación basada en un análisis estadístico de los N resultados experimentales da lugar a una evaluación de la incertidumbre de tipo A. La repetibilidad, reproducibilidad u otras estimaciones de precisión intermedias también se usan frecuentemente para evaluar la importancia de los efectos aleatorios.

La evaluación experimental es la mejor forma de estimar los componentes de incertidumbre. Sin embargo, hay veces que los experimentos no pueden realizarse debido a falta de tiempo, a la no disponibilidad de los recursos necesarios, o a la dificultad intrínseca en la estimación de la incertidumbre de un determinado bloque o parámetro. En este caso, la incertidumbre debe evaluarse a partir de trabajos

anteriores o bien a partir del criterio del analista. Estas estimaciones están definidas como una evaluación de la incertidumbre de tipo B.

Las estimaciones basadas en la utilización de datos anteriores se obtienen a partir de la información dada por los proveedores, por ejemplo la tolerancia del material volumétrico.

Algunos estudios anteriores pueden proporcionar también información de la incertidumbre asignada a los valores de materiales de referencia, o bien de los errores sistemáticos de los métodos detectados a través de ejercicios de inter-comparación.

Sin embargo, en otros casos la única forma de estimar la incertidumbre está basada en la opinión del analista. Por ejemplo, la evaluación de las diferencias entre el nivel de concentración del analito en el material de referencia y en la muestra, la cuantificación de la dependencia de la concentración del analito en estudios de recuperación, o la evaluación de las diferencias de la composición de la matriz entre el material de referencia y la muestra analizada, se estiman a partir de los conocimientos que tiene el analista sobre el mensurando y el procedimiento de medida. Estas estimaciones no son completamente objetivas.

Para obtener la incertidumbre total combinada del proceso de medida siguiendo el principio de propagación de los errores, los valores obtenidos a partir de efectos aleatorios y sistemáticos tienen que estar expresados en las mismas unidades: las incertidumbres estándar. Es frecuente que sea necesario convertir otras medidas de dispersión a incertidumbres estándar. Un ejemplo típico frecuentemente explicado en la literatura específica es el relacionado con el cálculo de la incertidumbre estándar debida a una dilución realizada con un matraz aforado. La información del matraz dada por el proveedor es $250 \pm 0,15$ mL. Si se puede asumir una distribución Gaussiana con un nivel de confianza del 95%, la incertidumbre estándar se calcula dividiendo 0,15 mL por 1.96 (valor z tabulado para ese nivel de confianza). Si la distribución del valor fuera una distribución t, 0.15 debería dividirse por el valor de t tabulado para el número de grados de

libertad considerados. Pero si no hay información sobre la función de distribución ni sobre el número de grados de libertad, únicamente puede asumirse que es igualmente probable que el valor esté en cualquier lugar dentro de los límites del intervalo (suponer una distribución rectangular de los valores). En este caso la incertidumbre estándar se obtiene dividiendo 0,15 por la raíz cuadrada de 3. Si los errores pequeños son más probables, la desviación estándar puede calcularse dividiendo el valor correspondiente a la mitad del intervalo por la raíz cuadrada de 9 o por la raíz cuadrada de 6 (dependiendo de que el analista asuma una distribución normal o bien una distribución triangular).

Combinación

Los componentes individuales de incertidumbre estimados como incertidumbres estándar se combinan siguiendo el principio de propagación de errores. Si una cantidad medida, y , es función de diferentes parámetros, $y = f(x_i, x_j, x_k, \dots)$, la incertidumbre combinada estándar viene dada por la expresión general:

$$u(y(x_{i,j}, \dots)) = \sqrt{\sum_{i=1,n} \left(\frac{\partial y}{\partial x_i} \cdot u(x_i) \right)^2 + \sum_{\substack{i,j=1,n \\ i \neq j}} \left(\frac{\partial y}{\partial x_i} \cdot \frac{\partial y}{\partial x_j} \cdot \text{cov}(x_{ik}) \right)}$$

Dónde:

X_i ($i = 1 \dots n$) son los parámetros de los que depende el resultado del mensurando.
 $u(x_i)$ incertidumbre del parámetro i expresada como incertidumbre estándar.
 $\text{cov}(x_{ik})$ es la covarianza entre x_i y x_k .

Si todos los parámetros que contribuyen al resultado del mensurando son independientes, el término correspondiente a la covarianza es cero, y la expresión general se simplifica:

$$u(y(x_{i,j}, \dots)) = \sqrt{\sum_{i=1,n} \left(\frac{\partial y}{\partial x_i} \cdot u(x_i) \right)^2}$$

Si la relación que hay entre el mensurando y los parámetros se expresa únicamente a través de sumas y restas, por ejemplo $y = x_i + x_j - x_k + \dots$, la incertidumbre estándar combinada viene dada por:

$$u(y(x_{i,j,\dots})) = \sqrt{\sum_{i=1,n} (u(x_i))^2} = \sqrt{u(x_i)^2 + u(x_j)^2 + u(x_k)^2 + \dots}$$

Por último, se debe calcular la incertidumbre combinada expandida, que por definición es la cantidad que define un intervalo alrededor del resultado de la medición, del cual se espera que comprenda los valores que razonablemente pudieran ser atribuidos al mensurando.

La incertidumbre expandida proporciona un intervalo correspondiente a un nivel de confianza especificado, y se obtiene multiplicando la incertidumbre combinada estándar por el factor de incertidumbre, k . Generalmente, se utilizan los valores $k=2$ o $k=3$, para obtener aproximadamente un nivel de confianza del 95% o del 99% respectivamente. En la mayoría de las situaciones prácticas, se recomienda utilizar el valor $k = 2$ [14].

5. MATERIALES Y METODOS

5.1. Materiales

Para la validación y estandarización de la metodología del análisis de mercurio se utilizaron materiales, equipos y recursos suministrados por el Laboratorio de Análisis de Aguas y Alimentos de la Universidad Tecnológica de Pereira.

Antes de proceder con los ensayos de validación, se realizó una búsqueda bibliográfica acerca de los métodos, el tratamiento estadístico de los datos y el funcionamiento del equipo de absorción atómica y el generador de vapor frío, con el objetivo de lograr el mejor desempeño y conseguir los datos más confiables.

5.1.1. Método de análisis de Mercurio por el método de espectrometría de absorción atómica-vapor frío.

Para la determinación del metal en estudio, se tomó como guía el Standar methods of examination of wáter and wastewater 21h edition, Washington, 2005, sección 3112B pagina 3-23 a 3-25.

Se realizaron ensayos preliminares con el objetivo de determinar los parámetros óptimos para el análisis de mercurio con el generador de vapor frío tales como: el mejor volumen de muestra a analizar en los viales de reacción, la velocidad de agitación y el tiempo de lectura de la absorción para la muestra.

Para la preparación de los patrones y los estándares para la validación y estandarización se utilizó una solución patrón de mercurio trazable a SRM de NIST {Hg(NO₃)₂ en HNO₃ 2 mol/l, 1000 mg/l Hg}.

5.1.2. Muestras de análisis

Para la realización de la validación del análisis de mercurio en agua cruda y tratada, se utilizaron, muestras naturales y suministradas por el laboratorio las cuales corresponden a:

- Agua Tratada: muestra tomada del grifo del laboratorio de Análisis de Aguas y Alimentos de la Universidad Tecnológica de Pereira en cada día de análisis.
- Agua cruda: muestra tomada de lago principal de la hacienda San Marcos, ubicada en el departamento de Caldas, municipio Viterbo, sector puente negro, callejón principal vía al Ingenio Risaralda.
- Muestras reales de agua suministradas por el Laboratorio de Análisis de Aguas y Alimentos de la Universidad Tecnológica de Pereira.

Para la realización de la estandarización del análisis de mercurio en pescados se utilizó pescado suministrado por el Laboratorio de Análisis de Aguas y Alimentos de la Universidad Tecnológica de Pereira, el cual corresponde a trucha comercializada por la empresa Pez Fresco ubicada en el sector de la florida.

5.2. Metodología

5.2.1. Metodología para la validación.

El procedimiento de validación fue extraído del procedimiento interno del Laboratorio de Análisis de Aguas y Alimentos de la Universidad Tecnológica, Verificación de métodos de ensayo con codificación 123-LAA-INT-17-V2, además del documento EURACHEM (A laboratory guide for the validation of methods and related topics), y el documento Protocolo de estandarización de métodos analíticos del instituto de hidrología, meteorología y estudios ambientales (IDEAM).

La descripción de las muestras tratadas con digestión es la siguiente:

üBK: Blanco de reactivos. (Agua desionizada)

üBb: Estándar de concentración baja. (0,8 µg/L para Hg)

üBa: Estándar de concentración alta. Aproximadamente el 90% del rango. (2,5 µg/L para Hg)

üBK_{AT}: Blanco agua tratada

üM1_{AT}: Muestra natural para ver efectos en la matriz real. (Agua Cruda + 0,8 µg/l Hg)

üM2_{AT}: Muestra natural para ver efectos en la matriz real. (Agua Cruda + 2,5 µg/l Hg)

üBK_{AC}: Blanco agua cruda

üM1_{AC}: Muestra natural para ver efectos en la matriz real. (Agua Tratada 0,8 µg/l Hg)

üM2_{AC}: Muestra natural para ver efectos en la matriz real. (Agua Tratada 2,5 µg/l Hg)

5.2.1.1. Reactivos.

- Agua Desionizada.
- Ácido Nítrico (HNO₃) al 65%
- Ácido Clorhídrico (HCl) al 37%
- Ácido Sulfúrico (H₂SO₄) al 98%
- Permanganato de Potasio (KMnO₄) al 5%^{m/v}

Se disuelven 5 g de KMnO₄ en 100 ml de agua desionizada.

- Cloruro de Hidroxilamina al 24%^{m/v}

Se disuelven 24 g de cloruro de Hidroxilamina en 100 ml de agua desionizada.

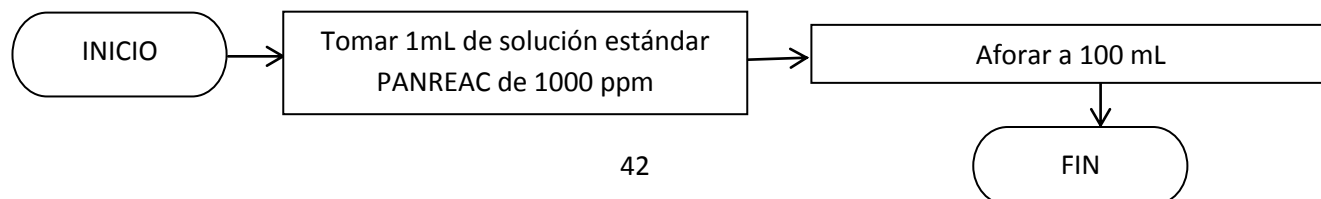
- Cloruro Estañoso (SnCl₂) al 10%^{m/v}

Se disuelven 10 g de SnCl₂ en 20 ml de HCl al 37% y se lleva a 100 ml con agua desionizada.

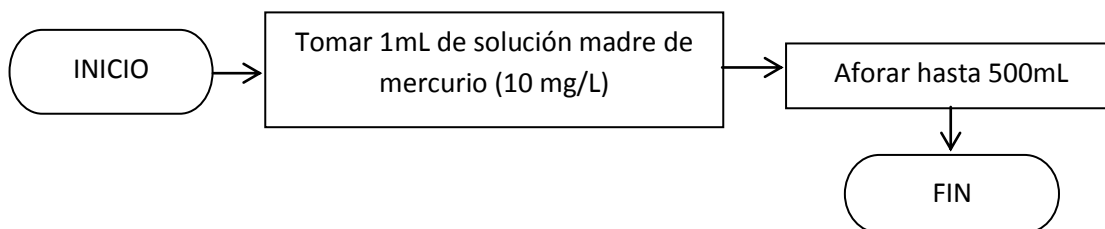
5.2.1.2. Curva de calibración

5.2.1.2.1. Preparación soluciones para curva de calibración.

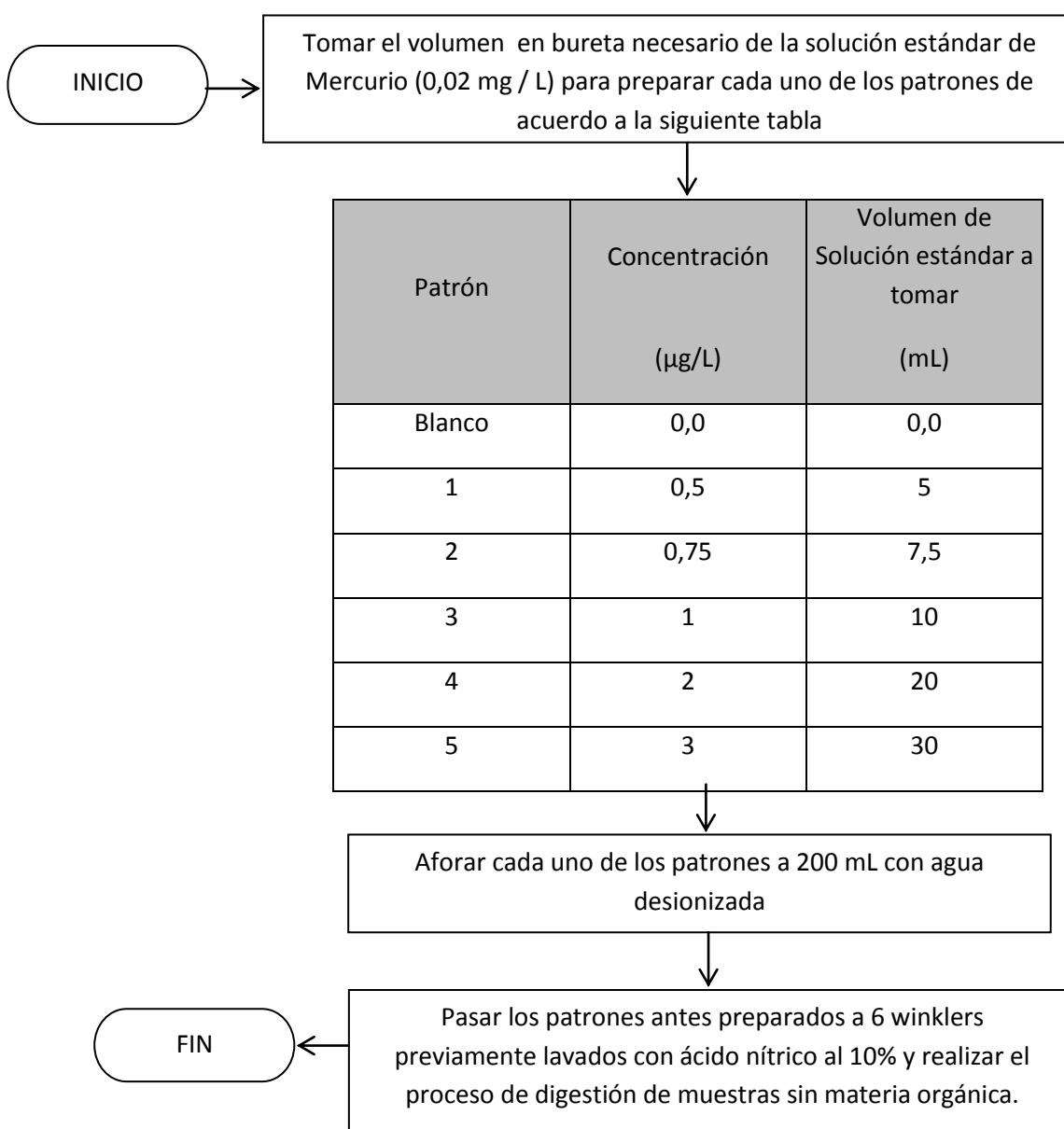
Solución madre de Mercurio (10 mg/L)



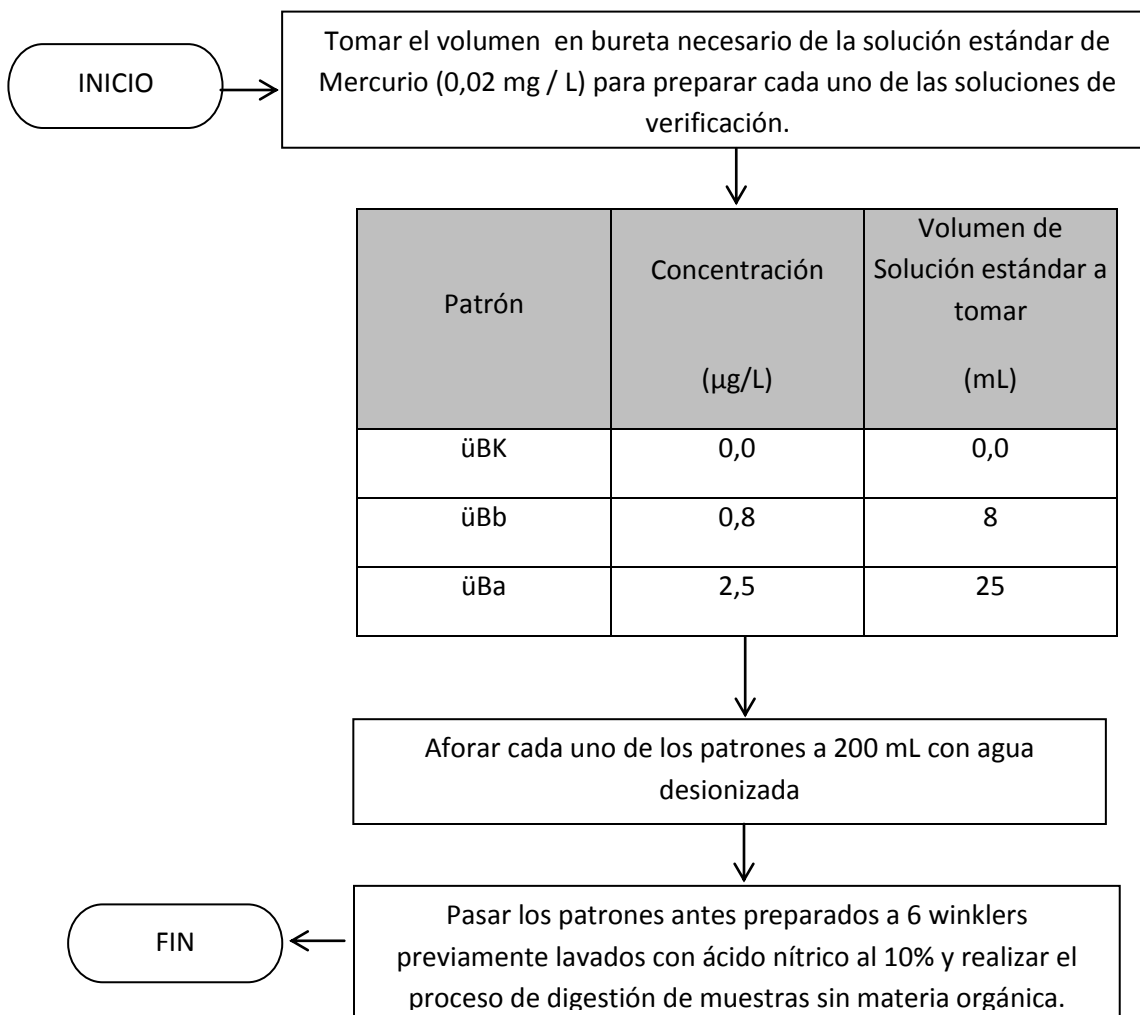
Solución estándar de Mercurio (0,02 mg/L)



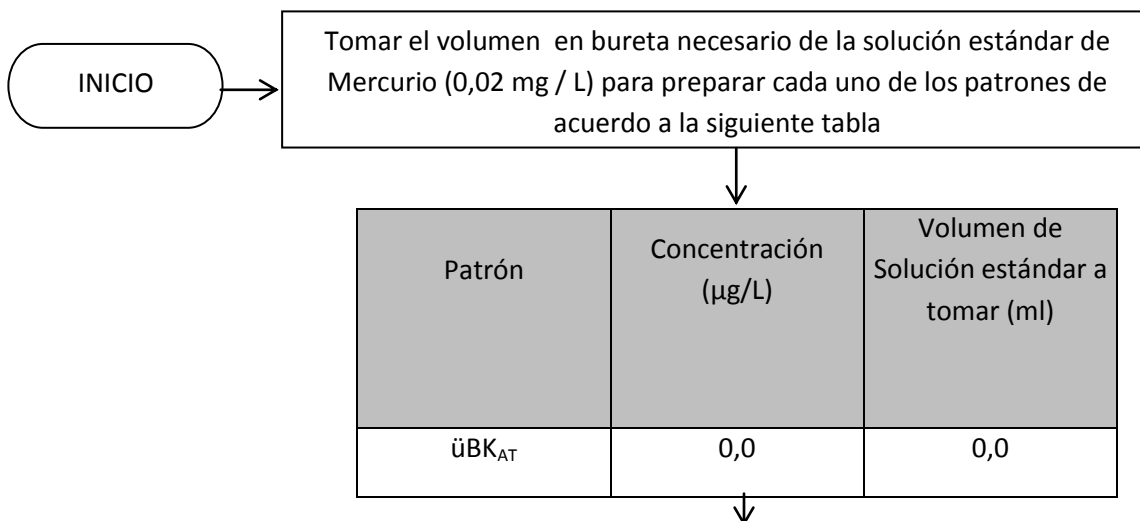
Patrones curva de calibración Mercurio



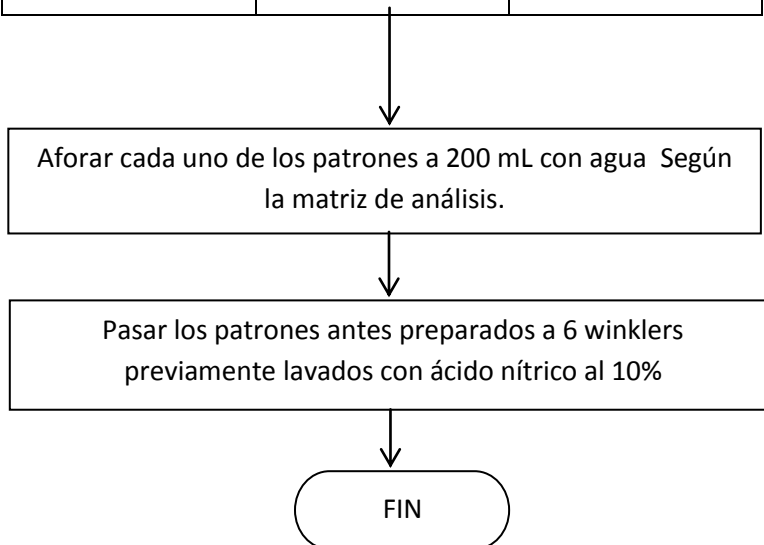
Preparación de soluciones para verificación



Preparación de muestras adicionadas



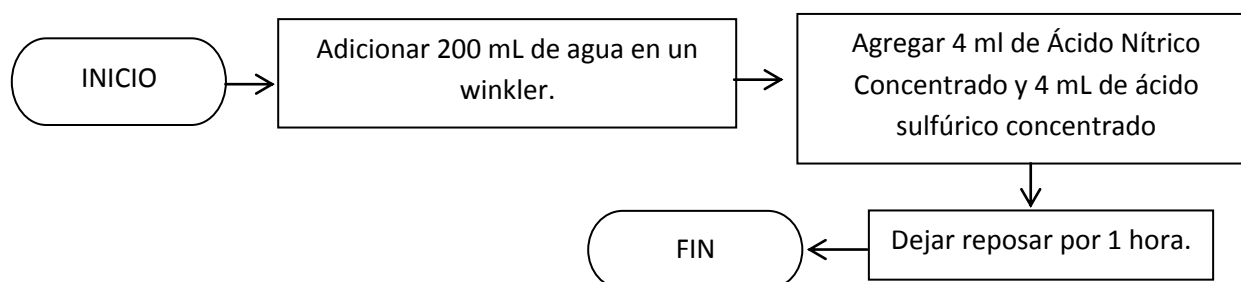
$\ddot{u}M_{1AT}$	0,8	8
$\ddot{u}M_{2AT}$	2,5	25
$\ddot{u}BK_{AC}$	0	0
$\ddot{u}M_{1AC}$	0,8	8
$\ddot{u}M_{2AC}$	2,5	25



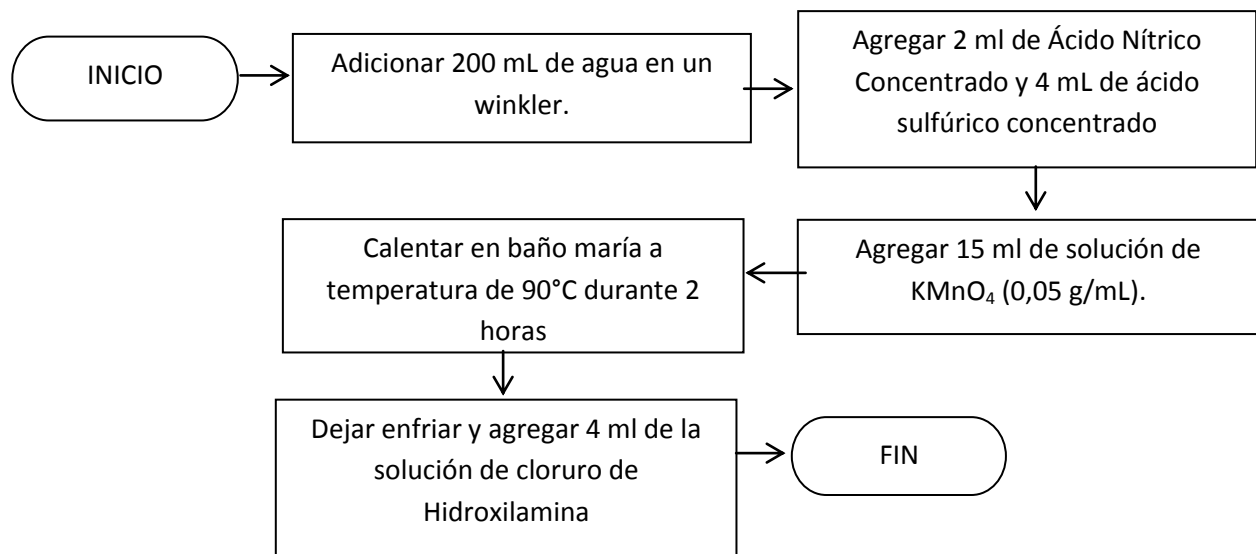
5.2.1.3. Digestión de muestras

Se realizaron ensayos para saber si había diferencia entre realizar digestión a las muestras que contienen materia orgánica y las que no, obteniendo que no hay diferencia apreciable entre las mediciones, por esta razón se establecieron 2 metodologías para la digestión de las muestras.

Digestión de muestras sin materia orgánica (patrones de la curva de calibración y muestras en agua tratada).

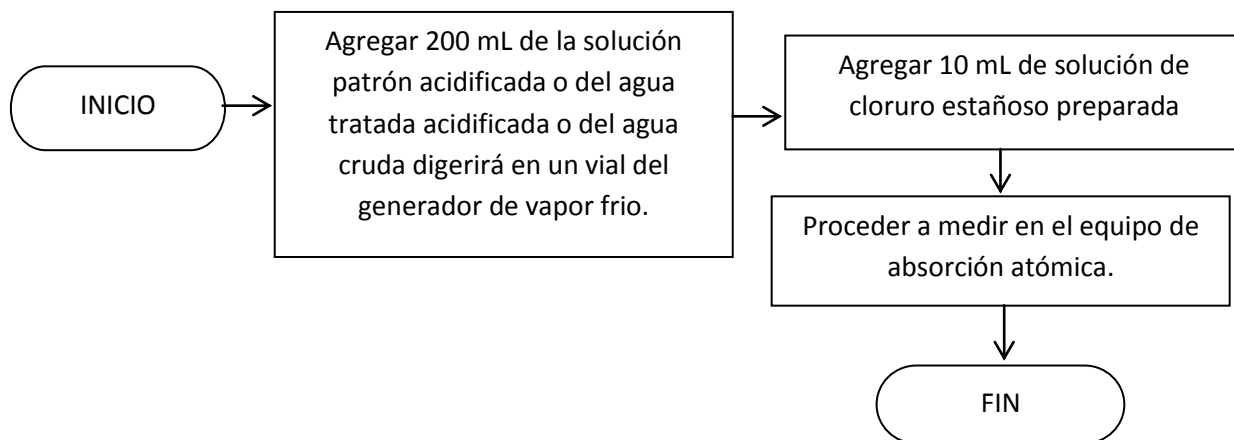


Digestión de muestras con materia orgánica (muestras en agua cruda).



5.2.1.4. Preparación de las muestras para la medición

Después de prender el equipo de absorción atómica e insertar la lámpara de mercurio, se deja calentar durante 1 hora, se ajustan los parámetros que aparecen en la tabla 3 y se procede a medir la concentración de mercurio como se observa en el siguiente diagrama:



Elemento	Longitud de onda (nm)	Slit (nm)	Corrección de fondo	Corriente de la lámpara (mA)	Tiempo de lectura (min)
Mercurio	253,7	0,7	BGC-D2	4	1

Tabla 3. Parámetros requeridos para la lectura de mercurio por AA-CV.

5.2.2. Metodología de estandarización.

El procedimiento de estandarización consistió en la verificación de que al realizar el proceso de digestión de la materia orgánica presente en el tejido muscular de los pescados pudiera eliminar las interferencias en la medición y se obtuvieran datos confiables a la hora de medir el mercurio.

Se usó el procedimiento de digestión encontrado en el ATOMIC ABSORPTION SPECTROPHOTOMETRY COOKBOOK, Section 6, Foodstuffs Analysis, Fertilizer and Feed Analysis de SHIMADZU CORPORATION, Kyoto Japon. Pg 15-17.

Para las mediciones se realizó la misma curva de calibración empleada para la validación y se contaminaron las muestras de pescado con dos estándares.

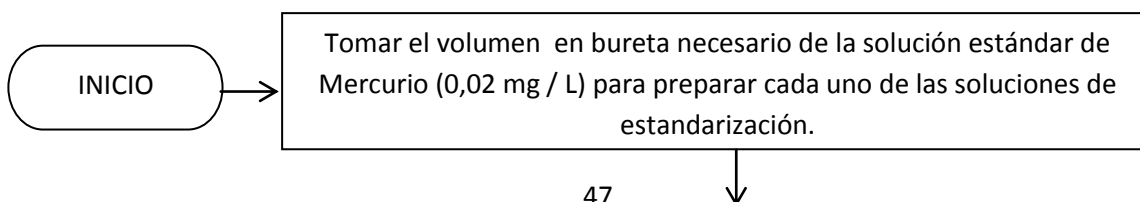
La descripción de las muestras tratadas con digestión es la siguiente:

üBK_p: Blanco de 1 g de pescado sin contaminar para digestión y aforado a 200 ml.

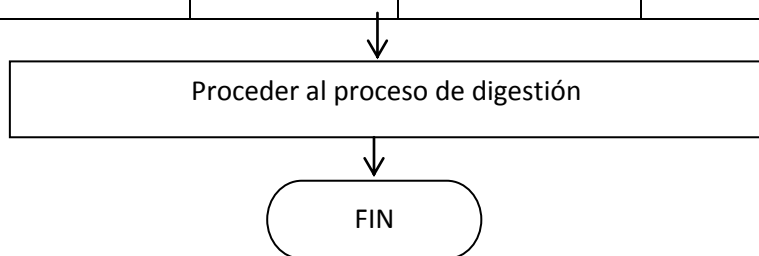
üB1_p: Muestra de 0,5 g de pescado contaminada con 2,5 µg de Hg/L para digestión y aforada a 200 ml

üB2_p: Muestra de 1 g de pescado contaminada con 2,5 µg de Hg /L para digestión y aforada a 200 ml

Preparación de las muestras



Patrón	Masa de pescado utilizada (g)	Concentración (µg/L)	Volumen de Solución estándar a tomar (ml)	Volumen de Agua a tomar (ml)
ÜBK _p	1	0,0	0,0	25
ÜB1 _p	0,5	2,5	25	0
ÜB2 _p	1	2,5	25	0



Digestión de las Muestras

La digestión se realizó usando el siguiente montaje:

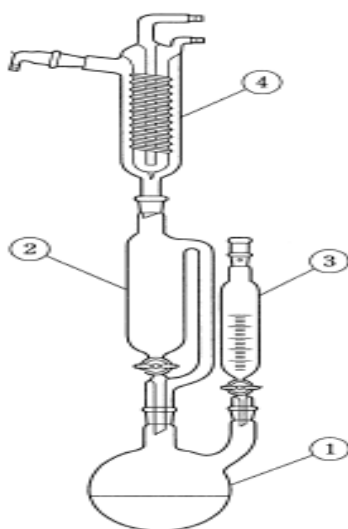
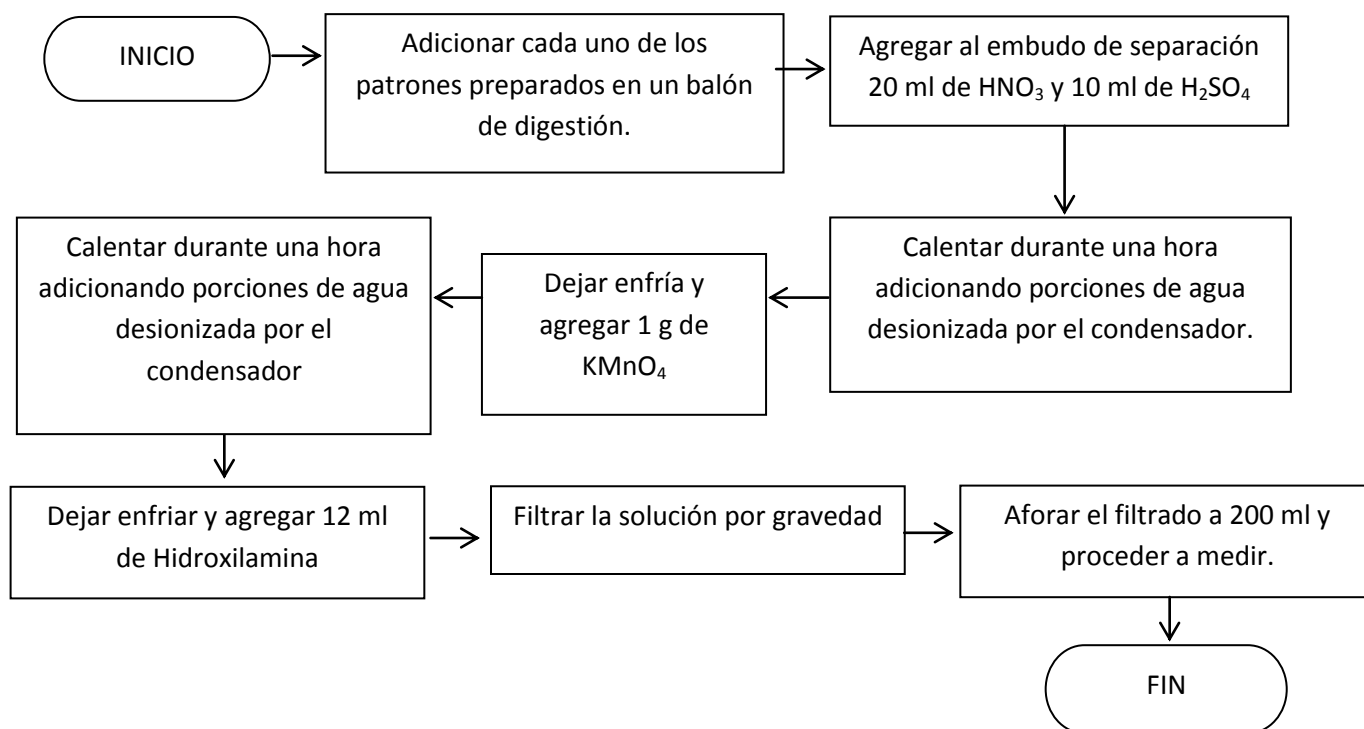


Fig. 4 Montaje realizado para la digestión de pescados.

Dónde:

- (1). Balón de digestión
- (2). Soxhlet para la recolección del condensado
- (3). Embudo de separación para ingresar los reactivos al balón de digestión.
- (4). Condensador.

Se realizó el proceso de digestión como se observa en el siguiente diagrama:



6. RESULTADOS Y ANALISIS

6.1. Análisis Preliminares.

Se compararon los diferentes volúmenes de solución depositados en el vial de reacción, (100, 150 y 200 ml) obteniéndose como mejor volumen para realizar las mediciones el de 200 ml, ya que en los viales de reacción el inyector de aire queda más sumergido en la solución (ver Fig. 5) y así genera una mejor promoción de los iones de mercurio presentes en la solución a la fase vapor y en esta sean arrastrados por la corriente de aire hacia la celda de medición, generando una mejor lectura de la absorbancia; lo anterior se observa en las siguientes gráficas y tablas

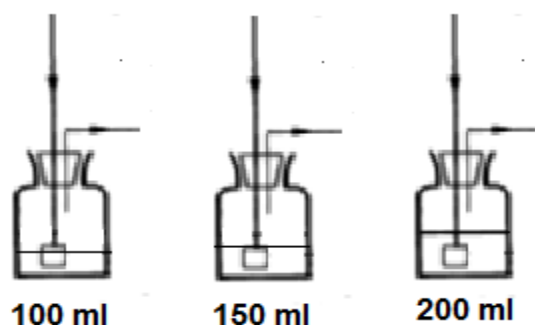
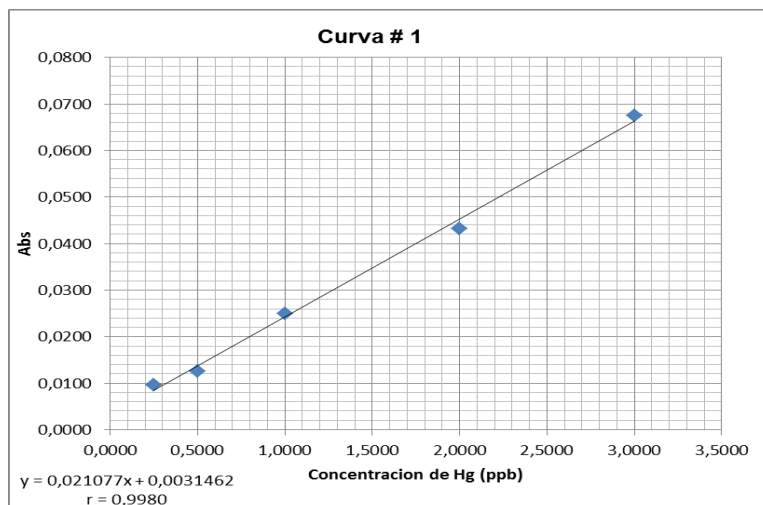


Fig. 5 Representación gráfica de los diferentes volúmenes utilizados en los viales de reacción.

Curva con 100 ml:

Curva # 1: Análisis de Mercurio en Aguas.			Fecha: 11/07/2012	
#	Tipo	Concentración (ppb)	Abs	Abs _{prom}
0	Blanco CC	0,0000	0,0067	0,0067
			0,0067	
1	Patrón CC	0,2500	0,0097	0,0096
			0,0095	
2	Patrón CC	0,5000	0,0127	0,0126
			0,0126	
3	Patrón CC	1,0000	0,0253	0,0250
			0,0247	
4	Patrón CC	2,0000	0,0428	0,0432
			0,0435	
5	Patrón CC	3,0000	0,0679	0,0676
			0,0672	

Tabla 4. Datos Curva de Calibración # 1.

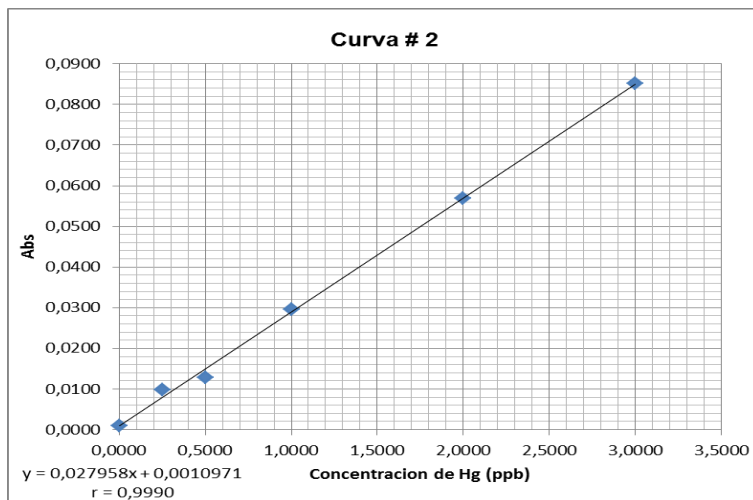


Grafica 1. Curva de Calibración # 1.

Curva con 150 ml:

Curva # 2: Análisis de Mercurio en Aguas			Fechas: 11/07/2012	
#	Tipo	Concentración (ppb)	Abs	Abs _{prom}
0	Blanco CC	0,0000	0,001	0,0010
			0,0009	
1	Patrón CC	0,2500	0,0097	0,0098
			0,0098	
2	Patrón CC	0,5000	0,0127	0,0128
			0,0129	
3	Patrón CC	1,0000	0,0296	0,0296
			0,0296	
4	Patrón CC	2,0000	0,0565	0,0569
			0,0573	
5	Patrón CC	3,0000	0,0854	0,0851
			0,0848	

Tabla 5. Datos Curva de Calibración # 2.

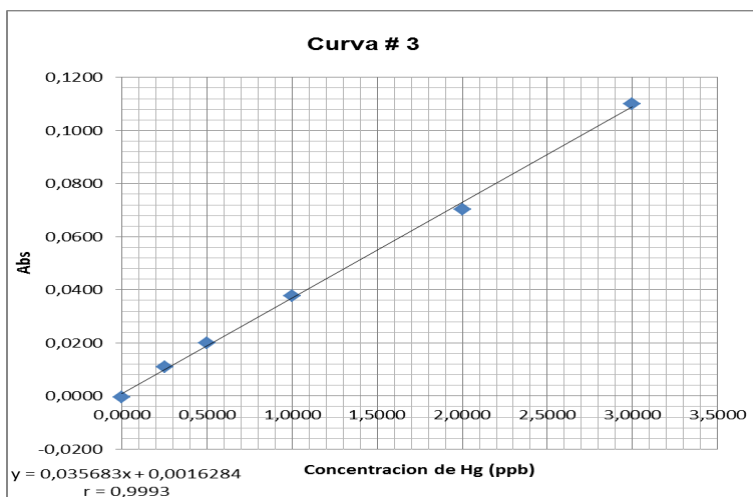


Grafica 2. Curva de Calibración # 2.

Curva con 200 ml:

Curva # 3: Análisis de Mercurio en Aguas				Fecha: 11/07/2013
#	Tipo	Concentración (ppb)	Abs	Abs _{prom}
0	Blanco CC	0,0000	-0,0007	-0,0006
			-0,0004	
1	Patrón CC	0,2500	0,0109	0,0109
			0,0108	
2	Patrón CC	0,5000	0,0199	0,0200
			0,0201	
3	Patrón CC	1,0000	0,0375	0,0376
			0,0377	
4	Patrón CC	2,0000	0,0699	0,0704
			0,0709	
5	Patrón CC	3,0000	0,1104	0,1102
			0,1099	

Tabla 6. Datos Curva de Calibración # 3.



Grafica 3. Curva de Calibración # 3.

Se leyó la primera muestra real suministrada por el Laboratorio de Análisis de Aguas y Alimentos de la Universidad Tecnológica de Pereira (Muestra 473-1) en una curva de calibración con buena correlación (Tabla 7, Grafica 4), observándose una alta concentración de mercurio, esto obligo a revisar si la fuente de esta muestra tenía alguna posibilidad de contaminación con este metal, lo cual se descartó y se concluyó que se tenían problemas de contaminación en los viales de reacción por efecto de los patrones; se realizó un mejor lavado de estos antes de las medidas y se corrió otra curva digerida el mismo día (Tabla 8, Grafica 5) pero preparada 19 días antes, observándose pequeñas variaciones entre las absorbancias de las dos curvas, lo que indicaba problemas en la conservación de

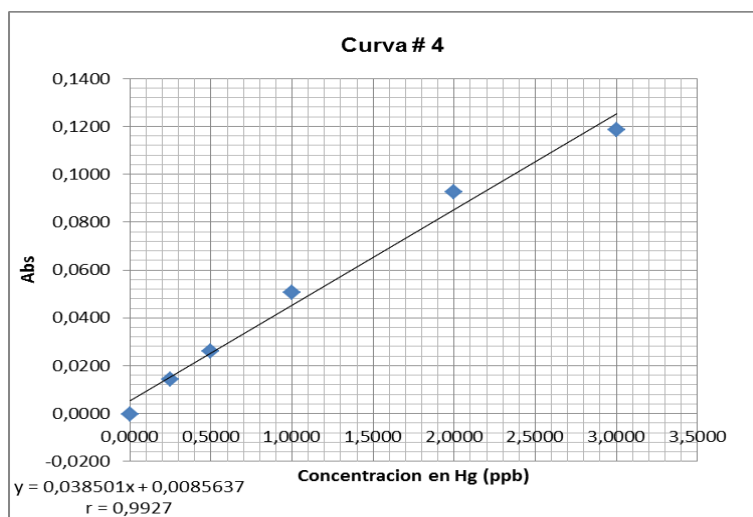
las muestras debido a la acidificación y ninguna concentración de mercurio como era de esperarse en la muestra 473-1; también se leyó una muestra desconocida (Muestra x) de la cual no se tenía información de la procedencia y se observó una concentración alta de mercurio superior al establecido en la resolución 2115 de 2007, que es 1 ppb de Hg.

Lo anterior se observa en las siguientes tablas y graficas:

Curva preparada el mismo día:

Curva # 4: Análisis de Mercurio en Aguas			Fecha: 30/07/2012	
#	Tipo	Concentración (ppb)	Abs	Abs _{Prom}
0	Blanco CC	0,0000	-0,0003	-0,0004
			-0,0004	
1	Patrón CC	0,2500	0,0142	0,0144
			0,0145	
2	Patrón CC	0,5000	0,0262	0,0261
			0,026	
3	Patrón CC	1,0000	0,0507	0,0508
			0,0508	
4	Patrón CC	2,0000	0,0933	0,0928
			0,0922	
5	Patrón CC	3,0000	0,1189	0,1186
			0,1182	
6	Muestra 473-1	1,9931	0,0853	0,0853
			0,0853	

Tabla 7. Datos Curva de Calibración # 4.

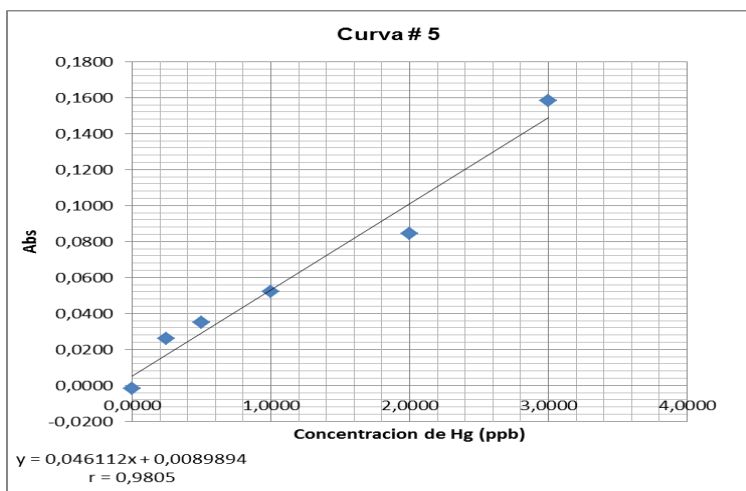


Grafica 4. Curva de Calibración # 4.

Curva preparada 19 días antes:

Curva # 5 Análisis de Mercurio en Aguas			Fecha: 30/07/2012	
#	Tipo	Concentración (ppb)	Abs	Abs _{Prom}
0	Blanco CC	0,0000	-0,0013	-0,0019
			-0,0025	
1	Patrón CC	0,2500	0,026	0,0259
			0,0257	
2	Patrón CC	0,5000	0,0352	0,0352
			0,0351	
3	Patrón CC	1,0000	0,0524	0,0522
			0,0519	
4	Patrón CC	2,0000	0,0847	0,0846
			0,0844	
5	Patrón CC	3,0000	0,1589	0,1585
			0,158	
6	Muestra x	2,5625	0,1273	0,1272
			0,127	
7	Muestra 473-1	-0,0041	0,0086	0,0088
			0,009	

Tabla 8. Datos Curva de Calibración # 5.



Grafica 5. Curva de Calibración # 5.

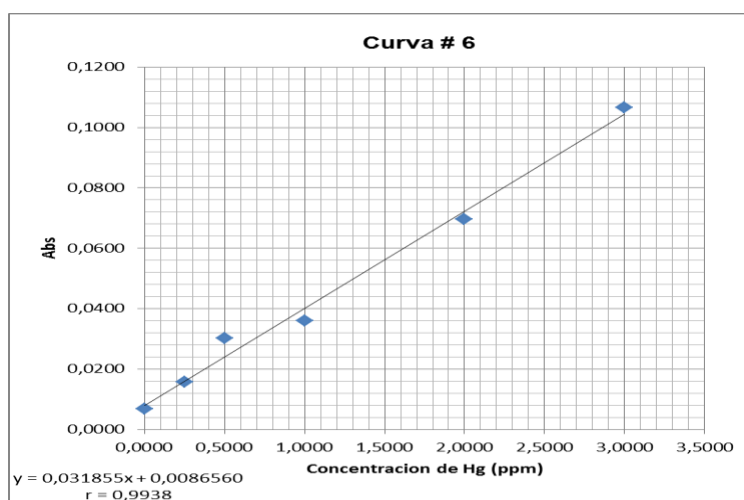
Se leyeron estándares contaminados con mercurio de agua desionizada, agua tratada y agua cruda preparados 10 días antes en una curva de calibración con muy buena correlación (Tabla 9, Grafica 6), para evaluar la conservación de las muestras, no se observaron buenas absorbancias en los estándares y se tuvieron problemas con las digestiones de los blancos, además se leyeron muestras suministradas por el laboratorio de Aguas y Alimentos de la Universidad Tecnológica de Pereira (501-1 a 501-5, 508-1, 508-2, 513-1, 520-5, 520-6 y la muestra PICAAP) obteniéndose valores normales y bajo la norma excepto en la

muestra 508-2 y la PICAAP que se leyó por duplicado obteniéndose un valor coherente que se reportó en el examen del Programa Interlaboratorio de Control de Calidad de Aguas Potables echo al laboratorio; lo anterior se observa en la siguiente tabla y gráfica:

Curva # 6: Análisis de Mercurio en Aguas			Fecha: 09/08/2012	
#	Tipo	Concentración (ppb)	Abs	Abs _{Prom}
0	Blanco CC	0,0000	0,0069	0,0069
			0,0068	
1	Patrón CC	0,2500	0,016	0,0158
			0,0157	
2	Patrón CC	0,5000	0,0303	0,0302
			0,03	
3	Patrón CC	1,0000	0,0361	0,0360
			0,036	
4	Patrón CC	2,0000	0,0698	0,0696
			0,0695	
5	Patrón CC	3,0000	0,1072	0,1067
			0,1062	
6	Estándar 1,2 ppb Hg	1,0844	0,0432	0,0432
			0,0433	
7	Estándar 2,5 ppb Hg	2,1110	0,0761	0,0759
			0,0757	
8	Blanco H2O Tratada	0,2400	0,0163	0,0163
			0,0163	
9	H2O Tratada + 0,8 ppb Hg	0,7516	0,0423	0,0326
			0,0416	
10	H2O Tratada + 2,5 ppb Hg	2,2522	0,09	0,0804
			0,0896	
11	Blanco H2O Cruda	0,3938	0,0212	0,0212
			0,0213	
12	H2O Cruda + 0,8 ppb Hg	0,2713	0,0316	0,0173
			0,0315	
13	H2O Cruda + 2,5 ppb Hg	2,1423	0,0917	0,0769
			0,0906	
14	H2O Tratada +0,8 ppb Hg (SD)	0,1583	0,0228	0,0137
			0,0234	
15	Muestra 501-1	0,1113	0,0123	0,0122
			0,0122	
16	Muestra 501-2	-0,3475	-0,0024	-0,0024
			-0,0024	
17	Muestra 501-3	-0,2341	0,0013	0,0012
			0,0012	
18	Muestra 501-4	-0,2717	0	0,0000
			0	
19	Muestra 501-5	-0,2027	0,0022	0,0022
			0,0022	
20	Muestra 508-1	-0,3753	-0,0032	-0,0033
			-0,0034	

Curva # 6: Análisis de Mercurio en Aguas			Fecha: 09/08/2012	
#	Tipo	Concentración (ppb)	Abs	Abs _{Prom}
21	Muestra 508-2	12,8064	0,4176	0,4166
			0,4156	
22	Muestra 513-1	0,4911	0,0242	0,0243
			0,0244	
23	Muestra 520-5	-0,2341	0,0012	0,0012
			0,0012	
24	Muestra 520-6	-0,1650	0,0036	0,0034
			0,0033	
25	PICAAP	1,4297	0,0544	0,0542
			0,0541	
26	PICAAP	1,4486	0,0546	0,0548
			0,0549	

Tabla 9. Datos Curva de Calibración # 6.



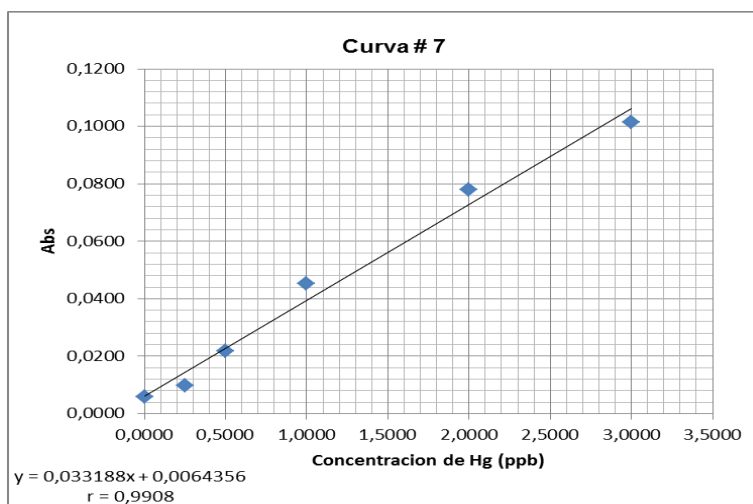
Gráfica 6. Curva de Calibración # 6.

Se leyeron muestras guardadas preparadas 7 días antes y acidificadas, pero se obtuvieron lecturas de absorbancias por debajo de las esperadas en todas las muestras leídas, lo que indico mal acidificación y se corrigió, además se leyó de nuevo la muestra 508-2 que había arrojado un valor por fuera del rango permitido para mercurio y se obtuvo que esta no poseía concentración alguna de mercurio como era de esperarse; por último se repitió la lectura de la muestra PICCAP pero también arrojó un valor debido a una mala dilución en la preparación de esta inferior de concentración al encontrado por duplicado en la lectura anterior.

Lo anterior se observa en la siguiente tabla y gráfica:

Curva # 7: Análisis de Mercurio en Agua			Fecha: 16/08/2012	
#	Tipo	Concentración (ppb)	Abs	Abs _{Prom}
0	Blanco CC	0,0000	0,0058	0,0058
			0,0057	
1	Patrón CC	0,2500	0,0098	0,0098
			0,0098	
2	Patrón CC	0,5000	0,0219	0,0218
			0,0218	
3	Patrón CC	1,0000	0,0456	0,0454
			0,0453	
4	Patrón CC	2,0000	0,078	0,0779
			0,0778	
5	Patrón CC	3,0000	0,1016	0,1013
			0,101	
6	Estándar 1,2 ppb Hg	0,4569	0,0217	0,0216
			0,0216	
7	Estándar 2,5 ppb Hg	1,5477	0,058	0,0578
			0,0577	
8	H2O Tratada + 0,8 ppb Hg	0,4931	0,023	0,0228
			0,0227	
9	H2O Tratada + 2,5 ppb Hg	1,7676	0,0651	0,0651
			0,0651	
10	H2O Cruda + 0,8 ppb Hg	0,1918	0,0144	0,0128
			0,0113	
11	H2O Cruda + 2,5 ppb Hg	2,1985	0,0795	0,0794
			0,0792	
12	Muestra 508-2	0,2309	0,0139	0,0141
			0,0143	
13	Metales PICAAP	0,8185	0,0336	0,0336
			0,0335	

Tabla 10. Datos Curva de Calibración # 7



Gráfica 7. Curva de Calibración # 7.

6.2. Análisis y datos de validación

Corrigiendo los inconvenientes obtenidos en las pasadas curvas de calibración se procedió a realizar los ensayos para la validación, obteniéndose los siguientes resultados.

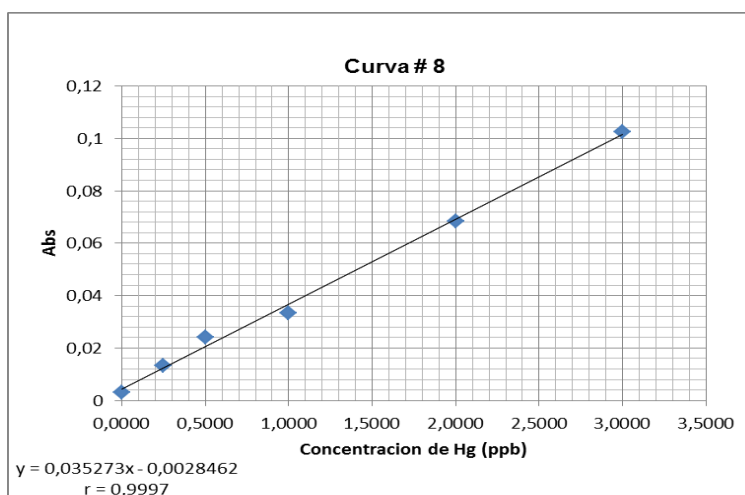
Se realizó el primer ensayo para la validación del análisis de mercurio en agua tratada y cruda obteniendo los porcentajes de recuperación en las 3 matrices que se ven en la tabla 12, estos porcentajes estuvieron entre el 75% y el 125% lo cual indica que hay muy buena recuperación de los analitos en las matrices, y que el método de digestión está eliminando bien las interferencias por materia orgánica, además la metodología para el análisis está trabajando de forma correcta y se puede proceder a realizar los ensayos necesarios para validar el método; además de esto se leyeron 3 muestras reales del Laboratorio de Análisis de Aguas y Alimentos de la Universidad Tecnológica de Pereira (Muestras: 570-1, 570-2 y 571-1) y se obtuvieron valores de concentración menores al permitido en la normatividad.

Lo anterior se observa en la siguiente tabla y gráfica:

Curva # 8: Análisis de Mercurio en Aguas			Fecha: 06/09/2012	
#	Tipo	Concentración (ppb)	Abs	Abs _{Prom}
0	Blanco CC	0,0000	0,0032	0,0032
			0,0033	
1	Patrón CC	0,2500	0,0137	0,0134
			0,0132	
2	Patrón CC	0,5000	0,0242	0,0242
			0,0243	
3	Patrón CC	1,0000	0,0334	0,0332
			0,0331	
4	Patrón CC	2,0000	0,0685	0,0683
			0,0681	
5	Patrón CC	3,0000	0,1027	0,1024
			0,102	
6	Estándar 1,2 ppb Hg	1,3451	0,0445	0,0446
			0,0447	
7	Estándar 2,5 ppb Hg	2,5982	0,0893	0,0888
			0,0883	
8	Blanco H2O Tratada	2,7796	0,0953	0,0952
			0,0951	
9	H2O Tratada + 1,2 ppb Hg (1)	1,4046	0,0467	0,0467
			0,0467	

Curva # 8: Análisis de Mercurio en Aguas			Fecha: 06/09/2012	
#	Tipo	Concentración (ppb)	Abs	Abs _{Prom}
10	H2O Tratada + 1,2 ppb Hg (2)	1,3394	0,0444	0,0444
			0,0444	
11	H2O Tratada + 2,5 ppb Hg	2,6237	0,0895	0,0897
			0,0899	
12	Blanco H2O Cruda	0,1374	0,002	0,002
			0,0021	
13	H2O Cruda + 1,2 ppb Hg	1,4358	0,0499	0,0478
			0,0498	
14	H2O Cruda + 2,5 ppb Hg	2,5415	0,0893	0,0868
			0,0884	
15	Muestra 570-1	0,1204	0,0014	0,0014
			0,0014	
16	Muestra 570-2	0,0750	-0,0004	-0,0002
			-0,0001	
17	Muestra 571-1	0,0495	-0,0011	-0,0011
			-0,0011	

Tabla 11. Datos Curva de Calibración # 8



Grafica 8. Curva de Calibración # 8.

Tipo	Media	% Recuperación
Estándar 1,2 ppb Hg	1,3451	112,0917
Estándar 2,5 ppb Hg	2,5982	103,9280
H2O Tratada + 1,2 ppb Hg	1,3720	114,3372
H2O Tratada + 2,5 ppb Hg	2,6237	104,9480
H2O Cruda + 1,2 ppb Hg	1,5266	127,2167
H2O Cruda + 2,5 ppb Hg	2,6322	105,2880

Tabla 12. Porcentajes de recuperación del primer ensayo de validación

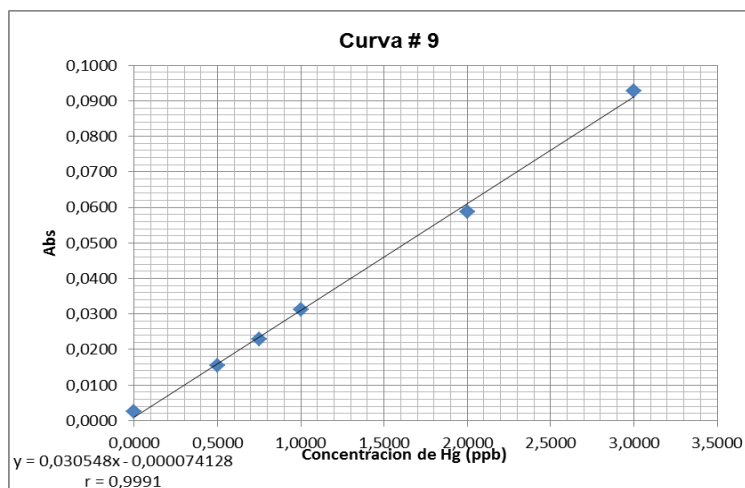
Se realizó la validación del análisis de mercurio en agua tratada obteniendo coeficientes de variación inferiores al 10 % y los porcentajes de recuperación estuvieron entre el 75% y 125% en ambos estándares, esto es lo requerido para que un proceso de validación sea acertado en el Laboratorio de Análisis de Aguas y Alimentos de la Universidad Tecnológica de Pereira. Además para calcular el límite de detección y límite de cuantificación se usó como blanco el estándar con 0,8 ppb de Hg arrojando como valor para estos: LD=0,2187 ppb Hg y LC=0,729 ppb Hg, siendo estos dos valores inferiores al de la norma (valor mínimo permitido para el mercurio: 1 ppb).

Lo anterior se observa en las siguientes tablas y gráfica:

Curva # 9: Análisis de Mercurio en Aguas			Fecha: 13/09/2012	
#	Tipo	Concentración (ppb)	Abs	Abs _{Prom}
0	Blanco CC	0,0000	0,0025	0,0026
			0,0028	
1	Patrón CC	0,5000	0,0153	0,0154
			0,0155	
2	Patrón CC	0,7500	0,0232	0,0230
			0,0229	
3	Patrón CC	1,0000	0,0312	0,0312
			0,0311	
4	Patrón CC	2,0000	0,0589	0,0587
			0,0585	
5	Patrón CC	3,0000	0,0933	0,0928
			0,0923	
6	Blanco H ₂ O Tratada	0,0352	0,0010	0,0010
			0,0009	
7	H ₂ O Tratada + 0,8 ppb Hg (1)	0,9026	0,0274	0,0275
			0,0276	
8	H ₂ O Tratada + 0,8 ppb Hg (2)	0,8339	0,0256	0,0254
			0,0252	
9	H ₂ O Tratada + 0,8 ppb Hg (3)	0,8732	0,0272	0,0266
			0,0260	
10	H ₂ O Tratada + 0,8 ppb Hg (4)	0,8732	0,0267	0,0266
			0,0265	
11	H ₂ O Tratada + 0,8 ppb Hg (5)	0,8666	0,0264	0,0264
			0,0264	
12	H ₂ O Tratada + 0,8 ppb Hg (6)	0,6997	0,0223	0,0213
			0,0203	
13	H ₂ O Tratada + 2,5 ppb Hg (1)	2,6409	0,0808	0,0806
			0,0804	
14	H ₂ O Tratada + 2,5 ppb Hg (2)	2,7686	0,0846	0,0845
			0,0844	
15	H ₂ O Tratada + 2,5 ppb Hg (3)	2,6311	0,0807	0,0803
			0,0799	

Curva # 9: Análisis de Mercurio en Aguas			Fecha: 13/09/2012	
#	Tipo	Concentración (ppb)	Abs	Abs _{Prom}
16	H2O Tratada + 2,5 ppb Hg (4)	4,8620	0,1489	0,1485
			0,1480	
17	H2O Tratada + 2,5 ppb Hg (5)	4,7949	0,1466	0,1464
			0,1462	
18	H2O Tratada + 2,5 ppb Hg (6)	4,6836	0,1430	0,1430
			0,1430	

Tabla 13. Datos curva de calibración # 9



Grafica 9. Curva de calibración # 9.

Tipo	Media	Desviación Estándar	Coefficiente de Varianza	Varianza	Mínimo	Máximo
H2O Tratada + 0,8 ppb Hg	0,8415	0,0729	8,6586	0,005309442	0,6997	0,9026
H2O Tratada + 2,5 ppb Hg	2,6695	0,0757	2,8373	0,005737101	2,5623	2,7686

Tabla 14. Variables estadísticas de la validación para agua tratada.

Tipo	Concentración (ppb)	% Recuperación
H2O Tratada + 0,8 ppb Hg (1)	0,9026	112,825
H2O Tratada + 0,8 ppb Hg (2)	0,8339	104,2375
H2O Tratada + 0,8 ppb Hg (3)	0,8732	109,15
H2O Tratada + 0,8 ppb Hg (4)	0,8732	109,15
H2O Tratada + 0,8 ppb Hg (5)	0,8666	108,325
H2O Tratada + 0,8 ppb Hg (6)	0,6996	87,45
H2O Tratada + 2,5 ppb Hg (1)	2,6409	105,636

Tipo	Concentración (ppb)	% Recuperación
H2O Tratada + 2,5 ppb Hg (2)	2,7686	110,744
H2O Tratada + 2,5 ppb Hg (3)	2,6311	105,244
H2O Tratada + 2,5 ppb Hg (4)	2,7407	109,628
H2O Tratada + 2,5 ppb Hg (5)	2,6736	106,944
H2O Tratada + 2,5 ppb Hg (6)	2,5623	102,492

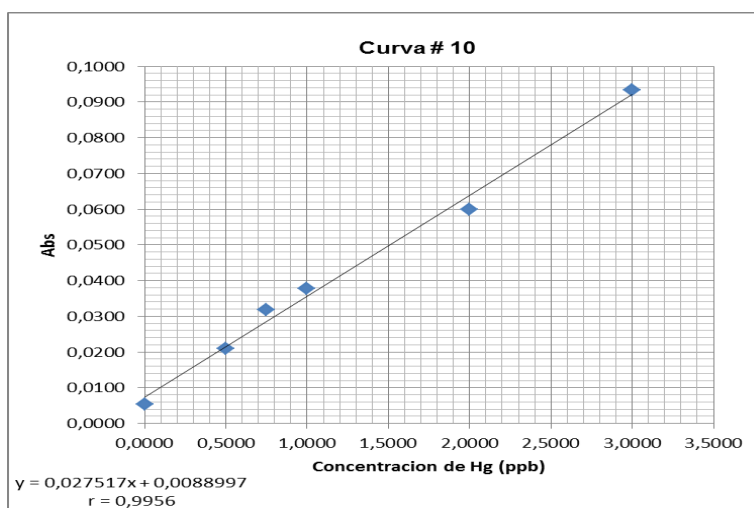
Tabla 15. Porcentajes de recuperación para validación de agua tratada.

Se realizó el primer análisis de una muestra contaminada con 0,8 ppb de mercurio, preparada 28 días antes y acidificada a un pH menor a 2 y refrigerada menor a 6°C (información encontrada en el Standar methods of examination of wáter and wastewater 21h edition, Washington, 2005, sección 1060 C, pagina 1-44), obteniéndose un valor aceptable de la absorbancia y con este una concentración cercana a la inicial, se procedió a analizar esta misma muestra contaminada en cada día de análisis para validar si hay diferencias en las concentraciones obtenidas y saber si este proceso de preservación de muestras contaminadas con mercurio si es el acertado; además se leyeron distintas muestras del laboratorio de aguas y alimentos de la Universidad Tecnológica de Pereira (Muestras: 650-1, 639-1, 648-10, 648-11 y PICAAP) obteniéndose valores coherentes y solo se tuvo problemas de contaminación en la lectura de la muestra PICAAP la que ninguno de los datos que se observaron fue coherente, con lo cual se concluyó que su concentración de mercurio fue la observada en la primera lectura del 09/08/2012.

Curva # 10: Análisis de Mercurio en Aguas			Fecha: 18/10/2012	
#	Tipo	Concentración (ppb)	Abs	Abs _{Prom}
0	Blanco CC	0,0000	0,0053	0,0054
			0,0056	
1	Patrón CC	0,5000	0,0209	0,0210
			0,0211	
2	Patrón CC	0,7500	0,0321	0,0319
			0,0317	
3	Patrón CC	1,0000	0,0378	0,0378
			0,0378	
4	Patrón CC	2,0000	0,0601	0,0600
			0,0600	

Curva # 10: Análisis de Mercurio en Aguas			Fecha: 18/10/2012	
#	Tipo	Concentración (ppb)	Abs	Abs _{Prom}
5	Patrón CC	3,0000	0,0938	0,0933
			0,0928	
6	Blanco H2O Desionizada	-0,4143	-0,0024	-0,0025
			-0,0026	
7	Muestra Guardada + 0,8 ppb Hg	0,7268	0,0289	0,0288
			0,0286	
8	Muestra PICAAP + 1 ppb Hg	4,2992	0,1277	0,1272
			0,1267	
9	Muestra 650-1	-0,1272	0,0053	0,0054
			0,0055	
10	Muestra 639-1	-0,2907	0,0009	0,0009
			0,0009	
11	Muestra 651-1	-0,3307	-0,0002	-0,0002
			-0,0001	
12	Muestra 648-10	-0,3016	0,0006	0,0006
			0,0006	
13	Muestra 648-11	-0,3307	-0,0002	-0,0002
			-0,0002	
14	Muestra PICAAP	3,6959	0,1116	0,1106
			0,1106	
15	Muestra PICAAP (SD) (Dil 1/2)	1,2392	0,0432	0,0430
			0,0427	
16	Muestra PICAAP (SD)	2,9727	0,0909	0,0907
			0,0905	

Tabla 16. Datos curva de calibración # 10.



Grafica 10. Curva de calibración # 10.

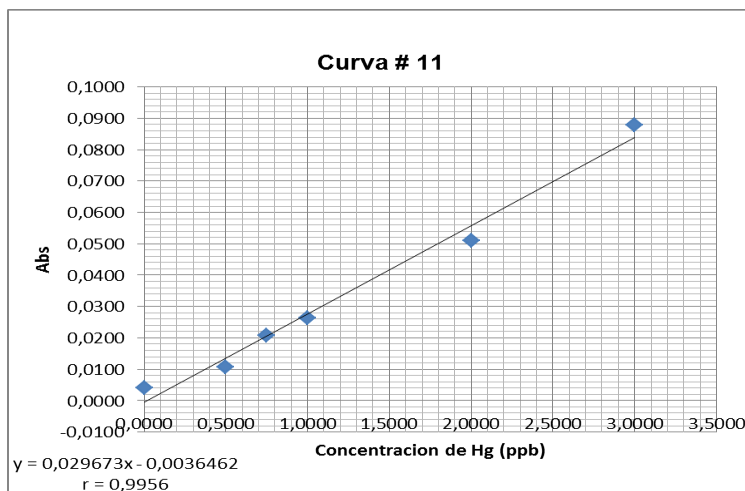
Se realizó las lecturas de 25 muestras del Laboratorio de Análisis de Aguas y Alimentos de la Universidad Tecnológica de Pereira, (Muestras 600-1 a la 600-25) no se observó concentración importante de mercurio en ninguna muestra.

Lo anterior se muestra en la siguiente tabla y gráfica:

Curva # 11: Análisis de Mercurio en Aguas			Fecha: 02/11/2012	
#	Tipo	Concentración (ppb)	Abs	Abs _{Prom}
0	Blanco CC	0,0000	0,0041	0,0041
			0,0041	
1	Patrón CC	0,5000	0,0106	0,0108
			0,0110	
2	Patrón CC	0,7500	0,0205	0,0208
			0,0210	
3	Patrón CC	1,0000	0,0264	0,0264
			0,0263	
4	Patrón CC	2,0000	0,0510	0,0510
			0,0509	
5	Patrón CC	3,0000	0,0881	0,0878
			0,0877	
6	Muestra Guardada + 0,8 ppb Hg	0,7699	0,0192	0,0191
		0,7632	0,0190	
7	Muestra 600-14 + 1 ppb Hg	1,2889	0,0346	0,0346
			0,0346	
8	Muestra 600-15 + 1 ppb Hg	1,7540	0,0482	0,0484
			0,0486	
9	Muestra 600-1	0,0959	-0,0007	-0,0008
			-0,0008	
10	Muestra 600-2	0,0858	-0,0011	-0,0011
			-0,0011	
11	Muestra 600-3	0,0757	-0,0015	-0,0014
			-0,0014	
12	Muestra 600-4	0,0285	-0,0028	-0,0028
			-0,0029	
13	Muestra 600-5	0,1027	-0,0005	-0,0006
			-0,0006	
14	Muestra 600-6	0,0386	-0,0025	-0,0025
			-0,0025	
15	Muestra 600-7	0,0622	-0,0018	-0,0018
			-0,0019	
16	Muestra 600-8	0,0487	-0,0022	-0,0022
			-0,0022	
17	Muestra 600-9	0,0319	-0,0027	-0,0027
			-0,0027	
18	Muestra 600-10	0,0285	-0,0028	-0,0028
			-0,0028	
19	Muestra 600-11	0,0184	-0,0030	-0,0031
			-0,0032	
20	Muestra 600-12	0,1600	0,0012	0,0011
			0,0010	
21	Muestra 600-13	0,1195	-0,0001	-0,0001
			-0,0001	
22	Muestra 600-14	0,0150	-0,0031	-0,0032
			-0,0034	

Curva # 11: Análisis de Mercurio en Aguas			Fecha: 02/11/2012	
#	Tipo	Concentración (ppb)	Abs	Abs _{Prom}
24	Muestra 600-16	0,0959	-0,0007	-0,0008
			-0,0008	
25	Muestra 600-17	0,0353	-0,0026	-0,0026
			-0,0025	
26	Muestra 600-18	0,0420	-0,0024	-0,0024
			-0,0023	
27	Muestra 600-19	0,0555	-0,0019	-0,0020
			-0,0020	
28	Muestra 600-20	0,0925	-0,0009	-0,0009
			-0,0009	
29	Muestra 600-21	0,1869	0,0019	0,0019
			0,0019	
30	Muestra 600-22	0,0690	-0,0016	-0,0016
			-0,0016	
31	Muestra 600-23	0,0757	-0,0014	-0,0014
			-0,0015	
32	Muestra 600-24	0,0319	-0,0027	-0,0027
			-0,0027	
33	Muestra 600-25	0,0959	-0,0008	-0,0008
			-0,0008	

Tabla 17. Datos curva de calibración # 11.



Grafica 10. Curva de calibración # 11.

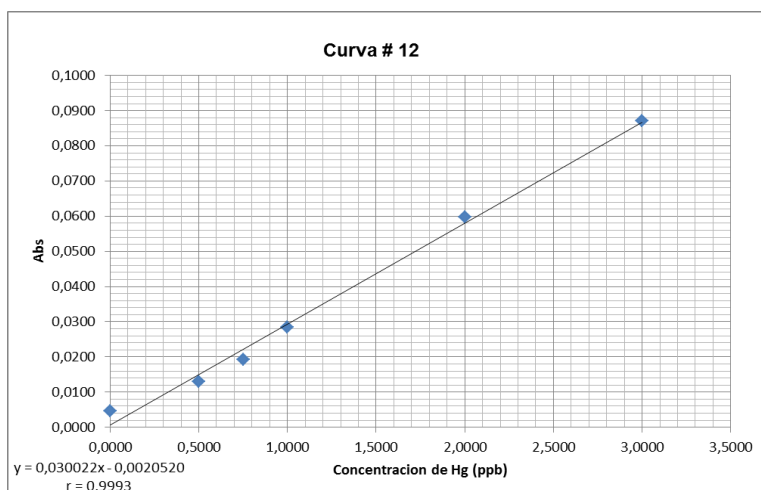
Se realizó la validación del análisis de mercurio en agua cruda obteniendo coeficientes de variación inferiores al 10 % y los porcentajes de recuperación estuvieron entre el 75% y 125% en ambos estándares, esto es lo requerido para que un proceso de validación sea acertado en el laboratorio de Aguas y Alimentos de la Universidad Tecnológica de Pereira. Además para calcular el límite de detección y límite de cuantificación se usó como blanco el estándar con 0,8 ppb de Hg arrojando como valor para estos: LD=0,1284 ppb Hg y LC=0,428 ppb Hg,

siendo estos dos valores inferiores al de la norma (valor mínimo permitido para el mercurio: 1 ppb).

Lo anterior se muestra en las siguientes gráficas y tablas:

Curva # 12: Análisis de Mercurio en Aguas.			Fecha: 08/11/2012	
#	Tipo	Concentración (ppb)	Abs	Abs _{Prom}
0	Blanco CC	0,0000	0,0047	0,0047
			0,0047	
1	Patrón CC	0,5000	0,0132	0,0129
			0,0126	
2	Patrón CC	0,7500	0,0195	0,0193
			0,0191	
3	Patrón CC	1,0000	0,0285	0,0285
			0,0285	
4	Patrón CC	2,0000	0,0599	0,0597
			0,0597	
5	Patrón CC	3,0000	0,0871	0,0870
			0,0868	
6	Blanco H2O Cruda	0,1849	0,0034	0,0035
			0,0036	
7	H2O Cruda + 0,8 ppb Hg (1)	0,8061	0,0221	0,0222
			0,0222	
8	H2O Cruda + 0,8 ppb Hg (2)	0,8594	0,0246	0,0238
			0,0229	
9	H2O Cruda + 0,8 ppb Hg (3)	0,7279	0,0197	0,0198
			0,0199	
10	H2O Cruda + 0,8 ppb Hg (4)	0,8011	0,0220	0,0220
			0,0220	
11	H2O Cruda + 0,8 ppb Hg (5)	0,8195	0,0225	0,0226
			0,0226	
12	H2O Cruda + 0,8 ppb Hg (6)	0,7945	0,0220	0,0218
			0,0216	
13	H2O Cruda + 2,5 ppb Hg (1)	2,5698	0,0754	0,0751
			0,0748	
14	H2O Cruda + 2,5 ppb Hg (2)	2,6082	0,0767	0,0763
			0,0758	
15	H2O Cruda + 2,5 ppb Hg (3)	2,9263	0,0858	0,0858
			0,0858	
16	H2O Cruda + 2,5 ppb Hg (4)	2,6648	0,0782	0,0780
			0,0777	
17	H2O Cruda + 2,5 ppb Hg (5)	2,6748	0,0787	0,0783
			0,0778	
18	H2O Cruda + 2,5 ppb Hg (6)	2,6365	0,0770	0,0771
			0,0772	
19	Muestra Guardada + 0,8 ppb Hg	0,8611	0,0238	0,0236
		0,8478	0,0234	

Tabla 18. Datos curva de calibración # 12.



Grafica 12. Curva de calibración # 12.

Tipo	Media	Desviación Estándar	Coeficiente de Varianza	Varianza	Mínimo	Máximo
H2O Cruda + 0,8 ppb Hg	0,8014	0,0428	5,3443	0,001834438	0,7279	0,8594
H2O Cruda + 2,5 ppb Hg	2,6800	0,1266	4,7224	0,016018072	2,5698	2,9263

Tabla 19. Variables estadísticas de la validación de agua cruda.

Tipo	Concentración (ppb)	% Recuperación
H2O Cruda + 0,8 ppb Hg (1)	0,8061	100,7625
H2O Cruda + 0,8 ppb Hg (2)	0,8594	107,425
H2O Cruda + 0,8 ppb Hg (3)	0,7279	90,9875
H2O Cruda + 0,8 ppb Hg (4)	0,8011	100,1375
H2O Cruda + 0,8 ppb Hg (5)	0,8195	102,4375
H2O Cruda + 0,8 ppb Hg (6)	0,7945	99,3125
H2O Cruda + 2,5 ppb Hg (1)	2,5698	102,792
H2O Cruda + 2,5 ppb Hg (2)	2,6082	104,328
H2O Cruda + 2,5 ppb Hg (3)	2,9263	117,052
H2O Cruda + 2,5 ppb Hg (4)	2,6648	106,592
H2O Cruda + 2,5 ppb Hg (5)	2,6748	106,992
H2O Cruda + 2,5 ppb Hg (6)	2,6365	105,46

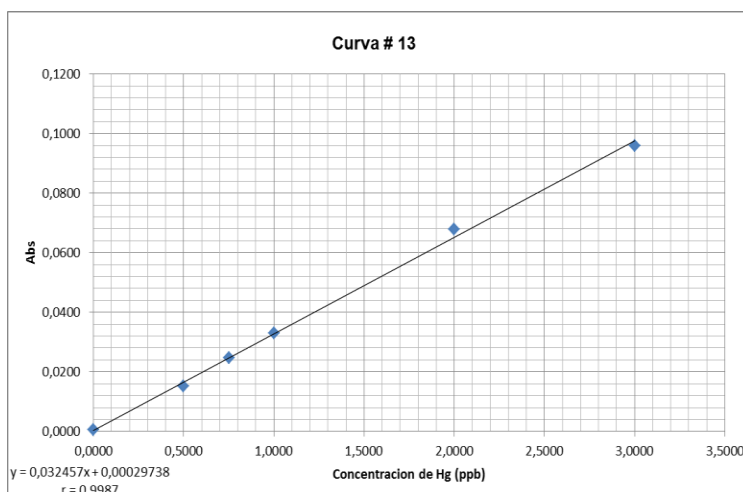
Tabla 20. Porcentajes de recuperación de la validación de agua cruda

Para saber estadísticamente si hay diferencia entre las concentraciones halladas con y sin digestión previa de las muestras a analizar, se plantea la siguiente hipótesis: no hay diferencia con un análisis de varianza a un factor entre las concentraciones observadas en la muestras analizadas con digestión previa y sin digestión previa; el análisis de varianza de un factor revela que el F calculado es inferior al valor crítico para F; Lo cual indica que la hipótesis es aceptada; por esta razón se pueden realizar análisis de mercurio en agua sin necesidad de realizar digestión previa a todas las muestras solo a las que posean una carga orgánica elevada.

Lo anterior se muestra en las siguientes tablas y graficas:

Curva # 13: Análisis de Mercurio en Aguas			Fecha: 16/11/2012	
#	Tipo	Concentración (ppb)	Abs	Abs _{Prom}
0	Blanco CC (SD)	0,0000	0,0007	0,0006
			0,0005	
1	Patrón CC (SD)	0,5000	0,0155	0,0152
			0,0150	
2	Patrón CC (SD)	0,7500	0,0247	0,0247
			0,0247	
3	Patrón CC (SD)	1,0000	0,0330	0,0330
			0,0330	
4	Patrón CC (SD)	2,0000	0,0679	0,0679
			0,0679	
5	Patrón CC (SD)	3,0000	0,0963	0,0960
			0,0958	
6	Blanco H2O Tratada (SD)	0,1324	0,0040	0,0040
			0,0041	
7	H2O Tratada + 0,8 ppb Hg (SD) (1)	0,7270	0,0233	0,0232
		0,7209	0,0231	
8	H2O Tratada + 0,8 ppb Hg (CD) (2)	0,8071	0,0259	0,0258
		0,7979	0,0256	
9	H2O Tratada + 2,5 ppb Hg (SD) (1)	1,8516	0,0608	0,0598
			0,0588	
10	H2O Tratada + 2,5 ppb Hg (CD) (2)	2,6126	0,0845	0,0845
			0,0845	
11	Muestra 786-1 (SD)	0,5021	0,0160	0,0160
			0,0160	

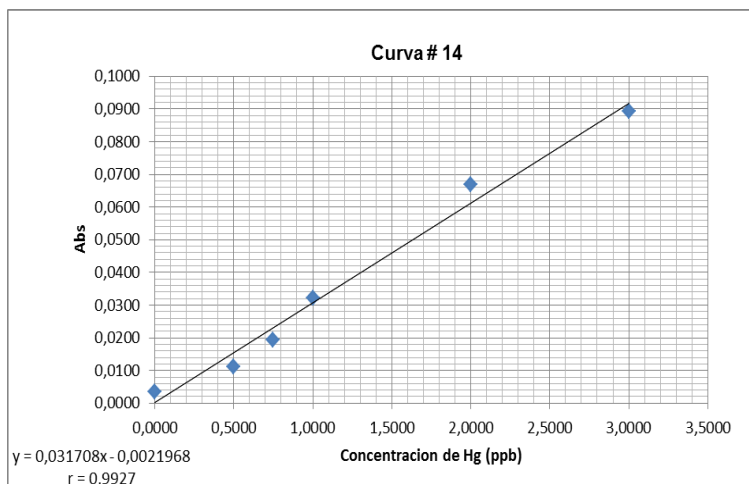
Tabla 21. Datos curva de calibración # 13.



Grafica 13. Curva de calibración # 13.

Curva # 14: Análisis de Mercurio en Aguas			Fecha: 16/11/2012	
#	Tipo	Concentración (ppb)	Abs	Abs _{Prom}
0	Blanco CC (CD)	0,0000	0,0037 0,0036	0,0036
1	Patrón CC (CD)	0,5000	0,0112 0,0111	0,0112
2	Patrón CC (CD)	0,7500	0,0196 0,0191	0,0194
3	Patrón CC (CD)	1,0000	0,0324 0,0321	0,0322
4	Patrón CC (CD)	2,0000	0,0675 0,0663	0,0669
5	Patrón CC (CD)	3,0000	0,0894 0,0890	0,0892
6	Blanco H2O Tratada (CD)	0,2017	0,0041 0,0043	0,0042
7	H2O Tratada + 0,8 ppb Hg (SD) (1)	0,8798 0,8703	0,0257 0,0254	0,0256
8	H2O Tratada + 0,8 ppb Hg (CD) (2)	0,8514 0,8735	0,0248 0,0255	0,0252
9	H2O Tratada + 2,5 ppb Hg (SD) (1)	2,7090	0,0841 0,0833	0,0837
10	H2O Tratada + 2,5 ppb Hg (CD) (2)	2,7421	0,0849 0,0846	0,0848
11	Muestra Guardada + 0,8 ppb Hg (CD)	0,8420 0,8357	0,0245 0,0243	0,0244
12	Muestra 698-1 (CD)	0,2017	0,0041 0,0043	0,0042
13	Muestra 698-2 (CD)	0,1576	0,0028 0,0028	0,0028
14	Muestra 718-1 (CD)	0,0630	-0,0002 -0,0002	-0,0002
15	Muestra 718-2 (CD)	0,0504	-0,0007 -0,0005	-0,0006

Tabla 22. Datos curva de calibración # 14.



Grafica 14. Curva de calibración # 14

RESUMEN						
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza		
0,8071	3	2,5228	0,8409	0,0015		
0,7270	3	2,4710	0,8236	0,0079		
ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0,00044	1	0,00044	0,0945	0,7738	7,7086
Dentro de los grupos	0,01891	4	0,00472			
Total	0,01936	5				

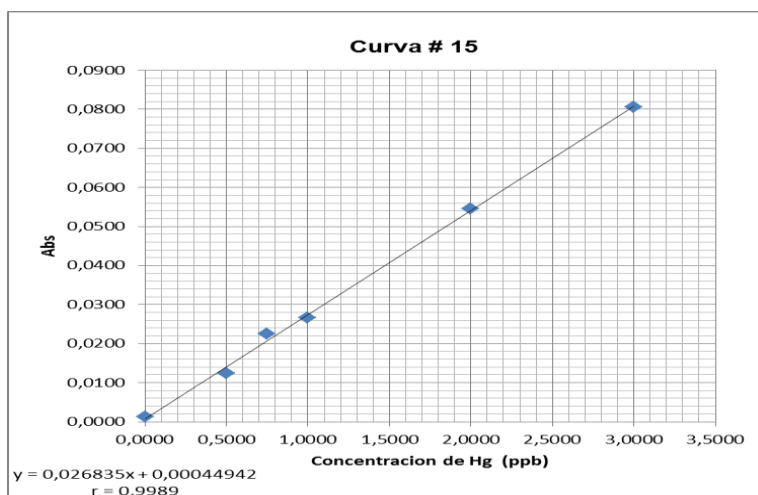
Tabla 23. Análisis de Varianza de un solo factor comparando si hay diferencia entre concentraciones de muestras con digestión y sin digestión.

Se realizó la última lectura de muestras del laboratorio de análisis de aguas y alimentos de la Universidad Tecnológica de Pereira (Muestras: 806-1; 774-2, 774-3, 806-1, 774-1, 774-1, 824-1), con digestión (CD) y sin digestión (SD) según si tenían una carga orgánica que generara interferencias en el análisis, las absorbancias obtenidas mostraron que no hay concentración importante de

mercurio, además se observa que los problemas observados por contaminación ya fueron solucionados.

Curva # 15: Análisis de Mercurio en Aguas			Fecha: 14/12/2012	
#	Tipo	Concentración (ppb)	Abs	Abs _{Prom}
0	Blanco CC (SD)	0,0000	0,0014	0,0013
			0,0012	
1	Patrón CC (SD)	0,5000	0,0124	0,0124
			0,0125	
2	Patrón CC (SD)	0,7500	0,0226	0,0226
			0,0225	
3	Patrón CC (SD)	1,0000	0,0266	0,0266
			0,0265	
4	Patrón CC (SD)	2,0000	0,0547	0,0546
			0,0546	
5	Patrón CC (SD)	3,0000	0,0807	0,0806
			0,0805	
6	Muestra 806-1 (SD)	0,1472	0,0044	0,0044
			0,0044	
7	Muestra 774-2 (SD)	0,1249	0,0037	0,0038
			0,0039	
8	Muestra 774-3 (SD)	0,0801	0,0026	0,0026
			0,0026	
9	Muestra 806-1 (CD)	0,0690	0,0023	0,0023
			0,0023	
10	Muestra 774-1 (CD)	0,1621	0,0047	0,0048
			0,0048	
11	Muestra 774-4 (CD)	0,0876	0,0028	0,0028
			0,0027	
12	Muestra 824-1	0,0652	0,0023	0,0022
			0,0022	

Tabla 24. Datos curva de calibración # 15.



Grafica 15. Curva de calibración # 15.

Para concluir la validación del análisis de mercurio en agua tratada y cruda se realizó un análisis de varianza de un factor para saber si había diferencias en la concentración de las muestras guardadas durante 2 meses y se observaron los siguientes resultados:

Para saber si estadísticamente hay diferencia entre las concentraciones halladas en las muestras contaminadas y guardadas durante 2 meses se plantea la siguiente hipótesis: no hay diferencia entre las concentraciones observadas en las muestras contaminadas y guardadas; el análisis de varianza de un factor revela que el F calculado es mayor al valor crítico para F; Lo cual indica que la hipótesis es rechazada; por esta razón es necesario medir las muestras tomadas en la mayor brevedad posible, ya que en el tiempo la concentración de mercurio se puede perder y el valor leído no sería el correcto.

Muestras Guardadas Contaminada con 0,8 ppb Hg			
N	Fecha	Concentración ppb	% de Recuperación
1	13/09/2012	0,7268	90,8543
		0,7159	89,4915
2	02/11/2012	0,7699	96,2415
		0,7632	95,3990
3	08/11/2012	0,8611	107,6377
		0,8478	105,9723
4	16/11/2012	0,8420	105,2447
		0,8357	104,4563

Tabla 25. Porcentajes de recuperación y concentraciones de muestras contaminadas con mercurio y guardadas durante 2 meses.

Tipo	Media	Desviación Estándar	Coeficiente de Varianza	Varianza	Mínimo	Máximo
Muestra Guardada + 0,8 ppb Hg	0,7953	0,0580	7,2932	0,0034	0,7159	0,8611

Tabla 26. Variables estadísticas de las muestras contaminadas con mercurio y guardadas durante 2 meses.

RESUMEN						
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza		
13/09/2012	2	1,4427	0,7213	5,94306E-05		
02/11/2012	2	1,5331	0,7665	2,27147E-05		
08/11/2012	2	1,7088	0,8544	8,87587E-05		
16/11/2012	2	1,6776	0,8388	1,98926E-05		
ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0,0233	3	0,00778	163,2414	0,000122	6,5913
Dentro de los grupos	0,00019	4	4,76992E-05			
Total	0,0235	7				

Tabla 27. Análisis de Varianza de 1 solo factor comparando si hay diferencia en la concentración de las muestras contaminadas con mercurio y guardadas durante 2 meses.

6.3. Datos y análisis de la estandarización determinación de mercurio en peces.

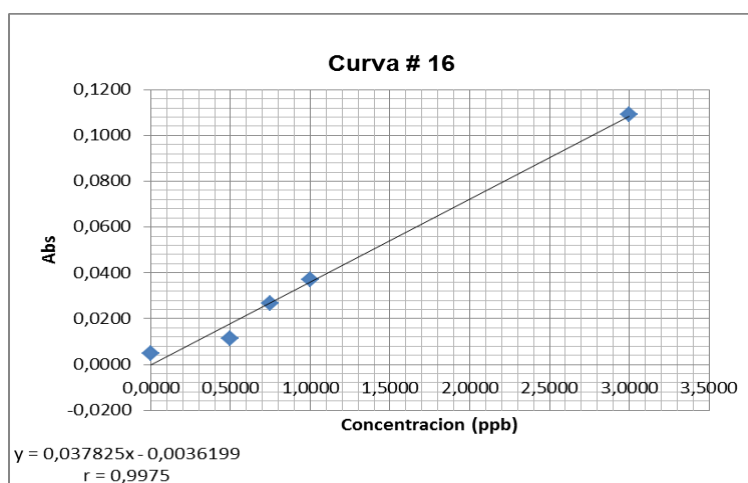
Con el equipo y la metodología mostrada anteriormente se procedió a estandarizar el análisis de mercurio en pescados, pesando 10 g, 1 g y 0,5 g de trucha, los datos obtenidos fueron los siguientes.

Se realizó el primer análisis de pescados usando el procedimiento de digestión encontrado en la NTC 1322 para productos de la pesca análisis fisicoquímicos y una masa de pescado de 10 g; Se observó que en este se usaba una cantidad muy grande de ácido sulfúrico la cual generaba interferencias colorimétricas negativas en las muestras y disminuyo totalmente la absorbancia de la muestra contaminada y la muestra sin contaminar. Se procedió a cambiar el procedimiento de digestión por el referenciado en la metodología y usar menos cantidad de pescado.

Lo anterior se observa en la siguiente tabla y gráfica:

Curva # 16 Análisis de Mercurio en Pescados			Fecha: 12/02/2013	
#	Tipo	Concentración (ppb)	Abs	Abs _{Prom}
0	Blanco CC	0,0000	0,0047	0,0048
			0,0049	
1	Patrón CC	0,5000	0,0113	0,0113
			0,0113	
2	Patrón CC	0,7500	0,0265	0,0267
			0,0269	
3	Patrón CC	1,0000	0,0374	0,0370
			0,0366	
4	Patrón CC	3,0000	0,1097	0,1091
			0,1085	
5	Pescados Digestión	-0,4542	-0,0206	-0,0208
			-0,0211	
6	Pescados Digestión + 2,5 ppb Hg	-0,4595	-0,0211	-0,0210
			-0,021	

Tabla 28. Datos curva de calibración # 16.



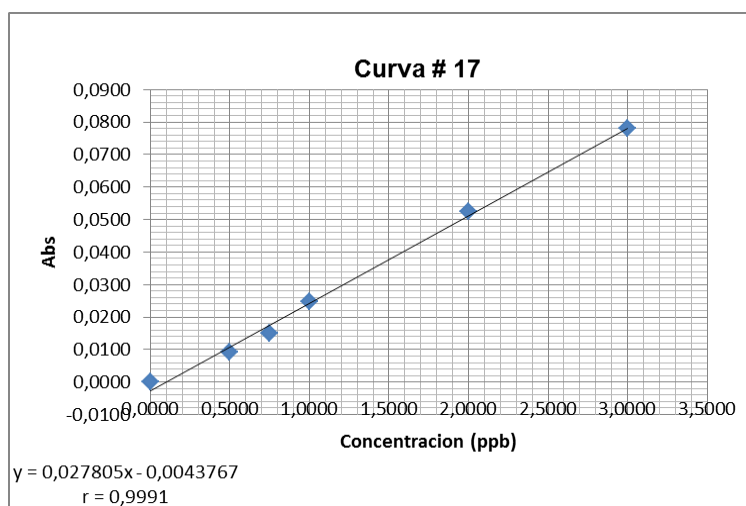
Grafica 16. Curva de calibración # 16.

Se realizó cambio de método de digestión y cambio en la masa de digestión, se observaron mejores resultados y se comprobó la eliminación de la interferencia por el ácido sulfúrico, pero se observó problemas con el tiempo de digestión y la adición del permanganato de potasio, ya que este debía agregarse en solución y para diluirlo superaba el volumen de aforo, esto se corrigió adicionando el permanganato sólido al balón de digestión y aumentando el tiempo de digestión a 2 horas.

Lo anterior se observa en la siguiente tabla y gráfica:

Curva # 17 Análisis de Mercurio en Pescados			Fecha: 03/04/2013	
#	Tipo	Concentración (ppb)	Abs	Abs _{Prom}
0	Blanco CC	0,0000	0	0,0000
			0	
1	Patrón CC	0,5000	0,0092	0,0092
			0,0093	
2	Patrón CC	0,7500	0,0152	0,0152
			0,0151	
3	Patrón CC	1,0000	0,0246	0,0248
			0,0251	
4	Patrón CC	2,0000	0,0525	0,0524
			0,0524	
5	Patrón CC	3,0000	0,0784	0,0782
			0,0781	
6	Pescados Digestión + 2,5 ppb Hg	3,3007	0,0857	0,0874
			0,0891	
7	Pescados Digestión	-0,4810	-0,0177	-0,0178
			-0,0178	

Tabla 29. Datos curva de calibración # 17.



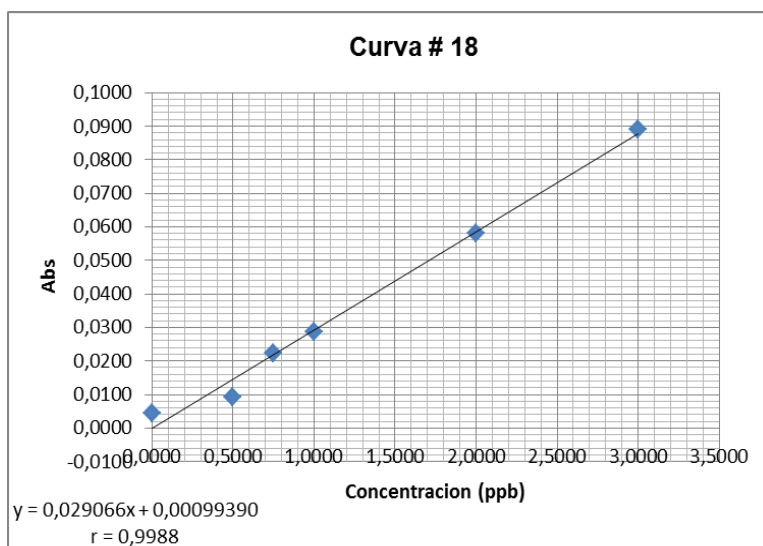
Grafica 17. Curva de calibración # 17.

Se realizó la lectura de 6 muestras con la digestión y los cambios establecidos anteriormente obteniendo 5 de 6 porcentajes de recuperación entre el 75 % y 125% lo cual indica que la técnica utilizada trabaja de forma correcta. Además se observó que se eliminaron todas las interferencias y problemas observados en las 2 curvas anteriores.

Lo anterior se observa en las siguientes tablas y graficas:

Curva # 18 Análisis de Mercurio en Pescados			Fecha: 10/04/2013	
#	Tipo	Concentración (ppb)	Abs	Abs _{Prom}
0	Blanco CC	0,0000	0,0044	0,0044
			0,0044	
1	Patrón CC	0,5000	0,0175	0,0092
			0,0175	
2	Patrón CC	0,7500	0,0223	0,0224
			0,0224	
3	Patrón CC	1,0000	0,0286	0,0286
			0,0285	
4	Patrón CC	2,0000	0,0581	0,0580
			0,0579	
5	Patrón CC	3,0000	0,0892	0,0891
			0,0891	
6	Pescados Digestión (1 g)	1,1768	0,035	0,0352
			0,0355	
7	Pescados Digestión (1 g) + 2,5 ppb Hg (1)	3,3650	0,0984	0,0988
			0,0991	
8	Pescados Digestión (1 g) + 2,5 ppb Hg (2)	3,6333	0,1051	0,1066
			0,108	
9	Pescados Digestión (0,5 g) + 2,5 ppb Hg (1)	3,3340	0,097	0,0979
			0,0988	
10	Pescados Digestión (0,5 g) + 2,5 ppb Hg (2)	4,1907	0,1216	0,1228
			0,124	
11	Pescados Digestión (0,5 g) + 2,5 ppb Hg (3)	4,9613	0,1447	0,1452
			0,01457	
12	Pescados Digestión (0,5 g) + 2,5 ppb Hg (4)	3,2480	0,0949	0,0954
			0,0959	

Tabla 30. Datos curva de calibración # 18.



Grafica 18. Curva de calibración # 18.

Porcentajes de recuperación			
N	Tipo	Concentración (ppb)	% de Recuperación
1	Pescados Digestión (1 g) + 2,5 ppb Hg (1)	3,3650	87,5226
2	Pescados Digestión (1 g) + 2,5 ppb Hg (2)	3,6333	98,2568
3	Pescados Digestión (0,5 g) + 2,5 ppb Hg (1)	3,3340	86,2841
4	Pescados Digestión (0,5 g) + 2,5 ppb Hg (2)	4,1907	120,5509
5	Pescados Digestión (0,5 g) + 2,5 ppb Hg (1)	4,9613	151,3773
6	Pescados Digestión (0,5 g) + 2,5 ppb Hg (2)	3,2480	82,8436

Tabla 31. Porcentajes de recuperación de la estandarización de pescados.

6.4. Calculo de la incertidumbre

Usando la metodología para el cálculo de la incertidumbre mencionada en el marco teórico, se calculó el valor de la incertidumbre combinada y expandida, este valor es alto ya que el aporte por los patrones es bastante alto, esto se debe a la falta de la calibración de un equipo, este valor se debe corregir y ajustar.

Fuentes de Incertidumbre:

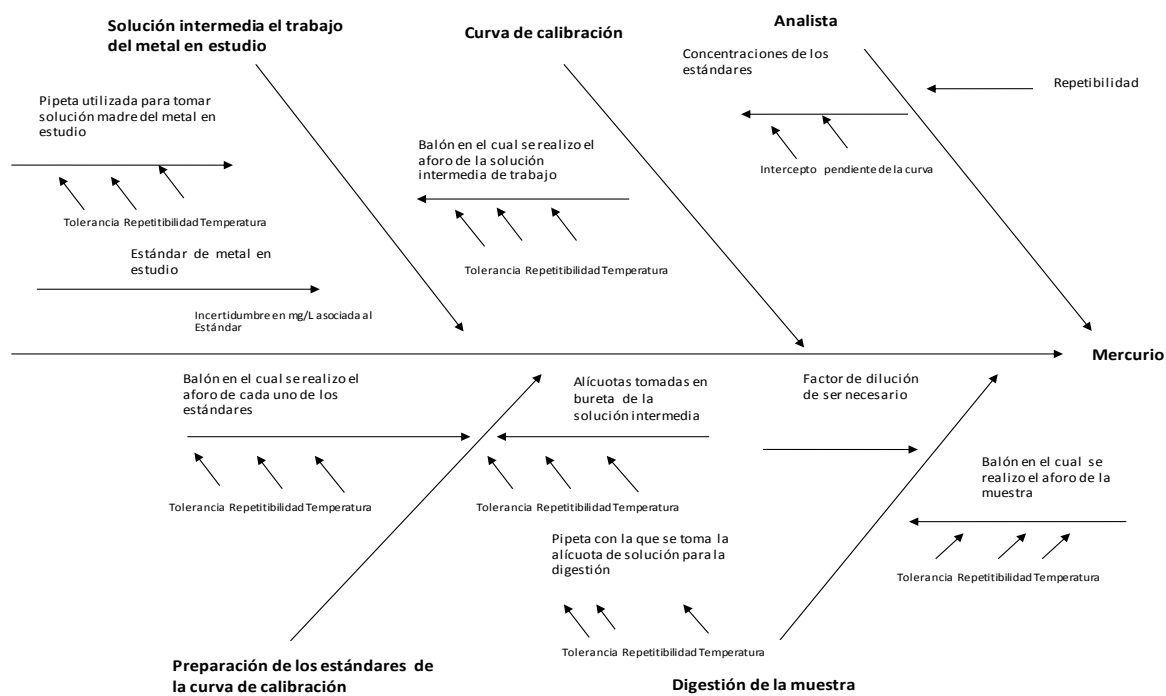


Fig. 6 Fuentes de Incertidumbre.

Lo anterior se puede ver en las siguientes tablas y graficas:

Laboratorio de Análisis de Aguas y Alimentos

FECHA: Mayo 8 2013

Método de Ensayo: Mercurio

RESPONSABLE : Felipe Arcila

Equipo: Shimadzu AA 7000

Identificación Fuentes de Incertidumbre:

Datos de Entrada	
1. Solución intermedia de trabajo del metal en estudio	
Volúmen (ml) de Solución de: 20 μg Hg/L preparada	500
Tolerancia del matraz de: 500 mL	0.4
σ de la Repetibilidad del matraz de: 500 mL	0.2265
Numero de repeticiones de la verificación del matraz de: 500 mL	10
Corrección de la Temperatura según coeficiente de expansión	0.3
2. Pipeta utilizada para tomar solución madre del metal en estudio	
Alícuota de estándar para preparar solución 20 μg /L	0.1
Tolerancia de la pipeta	0.001
σ Repetibilidad de la pipeta	0.0001
Numero de repeticiones de la verificación de la pipeta	10
Corrección de la Temperatura según coeficiente de expansión	0.0001
3. Preparación de los estándares de la curva de calibración	
Concentración de los patrones en mg/L	
Patrón 1	0.0005
Patrón 2	0.00075
Patrón 3	0.001
Patrón 4	0.002
Patrón 5	0.003
Volumen final de los patrones (mL)	200
Tolerancia del matraz de: 200 mL	0.4
σ Repetibilidad del matraz de: 200 mL	0.22
Numero de repeticiones de la verificación del matraz	10
Corrección de la Temperatura según coeficiente de expansión	0.3

4. Volúmen alícuota para cada patrón

Nº Patrones o estándares	5
Tolerancia de la bureta o Incertidumbre	0.03
σ Repetibilidad de la bureta	0.048386945
Numero de repeticiones de la verificación de la bureta	10
Corrección de la Temperatura según coeficiente de expansión	0.0006
Resolución de la bureta	0.05
Alícuota (mL) patrón 1	5
Alícuota (mL) patrón 2	7.5
Alícuota (mL) patrón 3	10
Alícuota (mL) patrón 4	20
Alícuota (mL) patrón 5	30

5. Estándar de metal en estudio

Concentración del Estándar (Scharlau) Hq	1000
Incertidumbre del Estándar (Scharlau) Hq	2

6. Curva de Calibración

Concentración patrón (mg/L)	Absorbancia
0.0005	0.0129
0.00075	0.0193
0.001	0.0285
0.002	0.0597
0.0	0.087

Pendiente de la curva	30.022
Intercepto de la curva	0.002052

7. Repetibilidad Analista

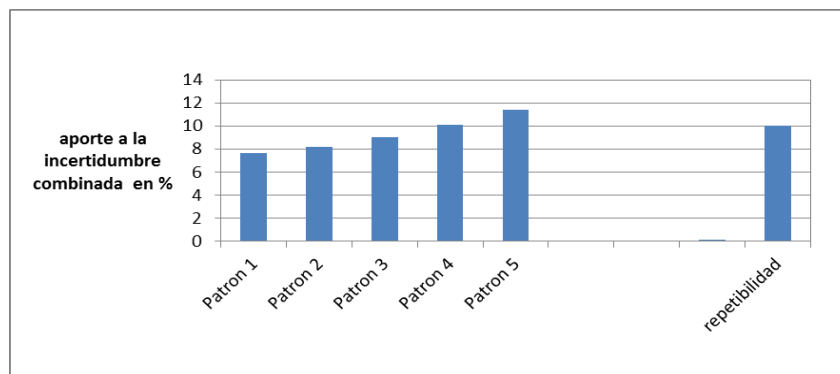
σ Repetibilidad de una muestra	0.0000729
Numero de repeticiones de la muestra	6
Concentración de Mercurio leído para la muestra	0.0008

Datos de Salida

Incertidumbre Estándar Combinada	0.000244277
Incertidumbre Expandida	0.000488554

Valor de Mercurio Total para la muestra		
0.0008000	+/-	0.00048855
		mq/L

Tabla 32. Calculo de la incertidumbre.



Grafica 19. Aportes de la incertidumbre combinada en el calculo de la incertidumbre total.

7. CONCLUSIONES

- Se concluye según los datos obtenidos experimentalmente que se validó el método de espectroscopia de absorción atómica-vapor frío para el análisis de mercurio en agua tratada y cruda también se estandarizó este método para el análisis de mercurio en pescados.
- Según los datos obtenidos en el análisis ANOVA para la varianza que existe entre las concentraciones de las muestras analizadas con digestión previa y sin digestión previa, se puede concluir que la digestión previa no es necesaria para muestras que no posean materia orgánica que presente interferencias, que por lo general son las muestras de agua tratada y los estándares preparados con agua desionizada, ahorrando así gran cantidad de tiempo en los análisis y dinero en cuanto a costos del análisis.
- Según los datos obtenidos en el análisis ANOVA para la varianza que existe entre las concentraciones de las muestras preparadas y leídas en lo corrido de dos meses se puede concluir que existe variación en las concentraciones y por este hecho los análisis de mercurio que se vayan a hacer a muestras que lleguen al laboratorio deben ser lo más pronto posible.
- Según los datos obtenidos para el límite de detección y el límite de cuantificación para aguas tratadas y crudas, estando estos por debajo del límite permitido por la resolución 2115 para el mercurio (1 ppb de Hg), se puede concluir que los análisis realizados de ahora en adelante por el Laboratorio de Aguas y Alimentos de la Universidad Tecnológica de Pereira para el mercurio tendrán la certeza de que el valor entregado a los clientes sea acertado y confiable.

8. RECOMENDACIONES

- Es importante tener en cuenta la importancia de lavar todo el material de vidrio que se va a utilizar durante todo el procedimiento y con agua desionizada y ácido nítrico al 10%, para sí evitar contaminación que genere lecturas erróneas.
- Es importante antes de realizar las lecturas en el equipo de absorción atómica encender y dejar calentar la lámpara de cátodo hueco para el mercurio 1 hora como mínimo para asegurar así las mejores absorbancias y con esto la mejor linealidad en la curva de calibración.
- Es importante seguir todas las consideraciones descritas en la metodología para el análisis de mercurio como tiempo de medida (1 min), Agitación (ajustar el control de agitación a $\frac{1}{2}$ de la capacidad del equipo), Volumen en los viales de reacción (200 ml), volúmenes de reactivos, etc. Ya que con estas fue comprobado que dicho análisis arroja los resultados más confiables.
- No se recomienda el guardado de las muestras para análisis de mercurio más de una semana ya que se pueden observar varianzas en la concentración, en el caso tal de que se deban guardar algún tiempo se deben acidificar y estar comprobando que el pH de la solución este por debajo de 2.
- Se recomienda tener cuidado con los pasos de funcionamiento para el generador de vapor frio ya que este cuenta con ciertos procedimientos que de no ser tenidos en cuenta pueden afectar los análisis.
- Se recomienda para el paso de las lecturas de los patrones a las muestras hacer una lectura de un blanco de agua desionizada para evitar que los

residuos de vapor de mercurio procedentes de los patrones no interfieran y alteren la concentración de las muestras a leer.

- los valores mostrados en las tablas son los reportados en por el equipo, por esta razón se observan valores negativos los cuales se deben a que la absorbancia registrada por la muestra es inferior a la registrada por el blanco de la curva de calibración.

9. BIBLIOGRAFIA

- [1]. Green Facts, Hechos sobre la salud y el medio ambiente [en línea]. <http://www.greenfacts.org/es/mercurio/mercurio-1.htm#2>
- [2]. Trudy Mckee y James R. Mckee. Bioquímica. LA BASE MOLECULAR DE LA VIDA. Tercera edición. Pagina 65. Capitulo 3. Mc GRAW HILL.
- [3]. Defensoría del pueblo Colombia, MINERÍA DE HECHO EN COLOMBIA Defensoría Delegada para los Derechos Colectivos y del Ambiente Diciembre de 2010 [en línea]. <http://www.defensoria.org.coredanexospublicacionesmineriaColombia.pdf.htm>
- [4]. Instituto geológico español IGE. El uso del mercurio en la minería artesanal y en pequeña escala. [en línea]. http://www.ige.org/WebRoot/acens/Shops/ige_org/4E39/903B/DF5B/C1F7/91D0/0A01/00CC/8961/Mercurio_en_la_Mineria_de_Au.pdf
- [5]. Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial – República de Colombia SUBDIRECCIÓN DE ESTUDIOS AMBIENTALES - GRUPO DE ACREDITACIÓN. DETERMINACIÓN DE MERCURIO TOTAL EN AGUAS Y SEDIMENTOS POR ESPECTROFOTOMETRÍA ATÓMICA – VAPOR FRIO Y EMISIÓN POR PLASMA
- [6]. ALVAREZ FERMIN, Luis Alberto y ROJAS, Luis Alfredo. Contenido de mercurio total en peces de consumo habitual en los asentamientos indígenas el plomo y el casabe - Estado Bolívar. uct. [online]. jun. 2009, vol.13, no.51 [citado 04 Junio 2012], p.097-102. Disponible en la World Wide Web: http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1316-8212009000200004&lng=es&nrm=iso. ISSN 1316-4821
- [7]. Validación de un método para determinar metilmercurio en tejido de pescado por cromatografía de gases, Instituto de Nutrición e Higiene de los Alimentos,

Luisa O. Vega Bolaños, José A. Arias Verdés, Gilberto Beltrán Llerandi, Odalys Castro Díaz y Olga L. Moreno Téllez.

[8]. Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible, Republica de Colombia Resolución 2115 del 2007. [en línea]. http://www.minambiente.gov.co/documentos/res_2115_220707.pdf

[9]. SÁNCHEZ D. Universidad Distrital Francisco José de Caldas. Validación de Métodos para la Determinación en Aguas Superficiales de Metales alcalinos (sodio y potasio) por absorción atómica a la llama y alcalinotérreos (calcio y magnesio) por volumetría EDTA. Disponible en internet: <http://gemini.udistrital.edu.co/comunidad/estudiantes/dlilian/contenido.htm>

[10]. MORENO C, GARCIA M. (2008). Nuevas alternativas para la simplificación y mejora de la metodología de análisis de metales pesados en muestras ambientales: <http://minerva.uca.es/publicaciones/asp/docs/tesis/JJPintoGanfornina.pdf>

[11]. International Laboratory Accreditation Cooperation (I.L.A.C.). *Razones por las cuales debería emplearse un laboratorio acreditado?*. Australia. Website: www.ilac.org Copyright ILAC 2010

[12]. Ciencia y tecnología para el desarrollo (C.Y.T.E.D.). Aspectos prácticos de la validación e incertidumbre en medidas químicas. 1a ed. - Buenos Aires: Ciencia y Tecnología para el Desarrollo -CYTED, 2009.

[13]. Methods for the determination and speciation of mercury in natural waters. review Kerstin Leopold, Michael Foulkes, Paul Worsfold. University of Plymouth, Plymouth PL4 8AA, United Kingdom.

[14]. Aspectos practicos de la validacion e incertidumbres en las medidas químicas. Programa iberoamericano de ciencia y tecnología para el desarrollo. Área de desarrollo sostenible. Ricardo O. Crubellati, Cecilia D. Di Risio.

[15]. Resolución 0670 del 2007 [en línea].
http://www.invima.gov.co/index.php?option=com_content&view=article&id=585:resolucion-0670-marzo-92007-&catid=106:resoluciones-2007&Itemid=154

10. ANEXOS